

**Entwicklung, Charakterisierung und Testung
von Nanopartikeln
zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke
auf Basis von Poly(butylcyanoacrylat)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Alexander Bootz
aus Münster

Frankfurt am Main, 2006

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:..... Prof. Dr. Harald Schwalbe

1.Gutachter:.....Prof. Dr. Jörg Kreuter

2.Gutachter:.....Prof. Dr. Michael Karas

Datum der Disputation:.....10. April 2006

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter angefertigt.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter danke ich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. Michael Karas möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates und die Möglichkeit die massenspektrometrischen Untersuchungen an seinem Institut durchführen zu können, bedanken.

Herrn Dr. Thomas Russ danke ich für die intensive Unterstützung bei der Molekulargewichtsbestimmung mittels MALDI-TOF MS und seine unermüdliche Bereitschaft zum „proof-reading“. Herrn Dr. Friedhelm Gores gilt Dank für die Unterstützung bei den GPC-Messungen.

Ich danke Herrn Dr. Vitali Vogel und Herrn Prof. Dr. Dieter Schubert für die gute Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Nanopartikel mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge. Herrn PD Dr. Hagen von Briesen danke ich für die Unterstützung bei den Zellkulturexperimenten am Georg-Speyer-Haus (GSH).

Bei Herrn Prof. Hartwig Wolburg möchte ich mich für die Transmissions-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Nanopartikel bedanken. Herrn Dr. Michael Kappl und Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Butt gilt Dank für die Möglichkeit am Raster-Kraft-Mikroskop zu arbeiten.

I would like to thank Dr. Svetlana Gelperina, Dr. Jagdish Jaiswal, Berta Sanchez de Juan and Dr. Hiro Yamamoto for the international and intensive collaboration.

Stellvertretend für alle Mitarbeiter am Institut für pharmazeutische Technologie und am Georg-Speyer-Haus, möchte ich mich bei Herrn Dr. Norbert Dinauer, Herrn PD Dr. Klaus Langer, Herrn Marc Lindenberg und Frau Anke Schwedat bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern Franz-Josef und Hildegard ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin und Lektorin Marion Anhorn.

1	Einleitung	1
2	Theorie	3
2.1	Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)	3
2.2	Arzneistofftransport über die Blut-Hirn-Schranke	6
2.2.1	Invasive Methoden	7
2.2.2	Nicht-Invasive Methoden	8
2.2.2.1	Lipophile Prodrugs / Wirkstoffanaloga	8
2.2.2.2	Carrier-vermittelter Transport	9
2.2.2.3	Rezeptor-vermittelte Transzytose	10
2.3	Partikuläre Trägersysteme	12
2.3.1	Nanopartikel (NP)	12
2.3.1.1	Gezielte Arzneistofftherapie (Drug Targeting) mit Nanopartikeln ..	15
2.3.1.2	Poly(butylcyanoacrylat)-Nanopartikel (PBCA-NP)	17
2.3.1.3	Fluoreszenzmarkierte Nanopartikel	21
2.3.2	Liposomen	23
2.3.3	Feste Lipidnanopartikel	24
2.4	Charakterisierung von Nanopartikeln	25
2.4.1	Dynamische Lichtstreuung	25
2.4.2	Mikroskopische Verfahren	27
2.4.3	Analytische Ultrazentrifugation	28
2.4.4	Gel-Permeations-Chromatographie	29
2.4.5	Massenspektrometrie	29
2.4.6	Arzneistoffbeladung	30
2.4.7	Zetapotential (ξ -Potential)	30
2.5	Tumorthherapie	32
2.5.1	Glioblastome	32
2.5.2	Doxorubicin	34
2.5.3	Doxorubicin-beladene PBCA-Nanopartikel	35

3	Material und Methoden.....	37
3.1	Nanopartikelherstellung.....	37
3.1.1	Emulsionspolymerisation	37
3.1.1.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	37
3.1.1.2	Polymerisation	39
3.1.1.3	Doxorubicin-beladene NP durch Emulsionspolymerisation.....	40
3.1.1.4	Phthalocyanin-beladene NP durch Emulsionspolymerisation	40
3.1.1.5	FITC-Dextran-beladene NP durch Emulsionspolymerisation	40
3.1.1.6	Propidiumiodid beladene NP durch Emulsionspolymerisation	41
3.1.1.7	Rhodamin-123 beladene NP durch Emulsionspolymerisation	41
3.1.1.8	Modifikation leerer NP mit DTAF.....	41
3.1.1.9	Adsorption von Rhodamin-6G an leere NP	42
3.1.2	Radikalische Polymerisation	42
3.1.2.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	42
3.1.2.2	Polymerisation	42
3.1.3	Nanopräzipitation	43
3.1.3.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	43
3.1.3.2	Polymerisation und Nanopräzipitation.....	43
3.1.3.3	Nile Red-beladene NP durch Nanopräzipitation.....	44
3.1.4	Coating der Nanopartikel	44
3.2	Charakterisierung der Nanopartikel.....	45
3.2.1	Dichte der Nanopartikelsuspension.....	45
3.2.2	Viskosität der Nanopartikelsuspension	45
3.2.3	Freier Formaldehyd in der Nanopartikelsuspension.....	46
3.2.3.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	46
3.2.3.2	Durchführung	46
3.2.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	48
3.2.4.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	48
3.2.4.2	Probenvorbereitung, Messung	48
3.2.5	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	49
3.2.5.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	49
3.2.5.2	Bestimmung des Durchmessers und der Partikelmasse.....	49
3.2.5.3	Bestimmung der Dichte der NP.....	50

3.2.6	Raster-Elektronenmikroskopie (REM).....	51
3.2.6.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	51
3.2.6.2	Probenvorbereitung, Messung	51
3.2.7	Raster-Kraft Mikroskopie (RKM)	51
3.2.7.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	51
3.2.7.2	Probenvorbereitung, Messung	52
3.2.8	Zetapotential der Nanopartikel	52
3.2.8.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	52
3.2.8.2	Probenvorbereitung und Messung	53
3.2.9	Polymergehalt – Gaschromatographie.....	53
3.2.9.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	53
3.2.9.2	Probenvorbereitung, Messung	54
3.2.10	Gel-Permeations Chromatographie (GPC)	55
3.2.10.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	55
3.2.10.2	Probenvorbereitung	55
3.2.11	MALDI-TOF Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS).....	56
3.2.11.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	56
3.2.11.2	Probenvorbereitung	56
3.2.12	Off-Line Kopplung von GPC und MALDI-TOF MS	57
3.2.13	Berechnung des mittleren Molekulargewichts.....	57
3.2.14	Arzneistoffbeladung mittels HPLC.....	59
3.2.14.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	59
3.2.14.2	Probenvorbereitung	60
3.2.15	Arzneistoffbeladung mittels UV/Vis	60
3.3	Zellkultur.....	62
3.3.1	Isolierung und Kultivierung von primären humanen Makrophagen	62
3.3.1.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	62
3.3.1.2	Isolierung von primären mononukleären Zellen	63
3.3.1.3	Isolierung und Kultivierung von Makrophagen	63
3.3.2	CaCo2 Zellkultur	63
3.3.2.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	64
3.3.2.2	Kultivierung von CaCo2-Zellen	64

3.3.3	Versuche zur zellulären Aufnahme von Nanopartikeln.....	65
3.3.3.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	66
3.4	Chemotherapie.....	66
3.4.1	Tiere	66
3.4.2	Implantation des Tumors.....	67
3.4.3	Behandlungsschema.....	67
3.5	Statistik.....	68
4	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel.....	69
4.1	Dichte und Viskosität der Nanopartikelsuspensionen.....	69
4.2	Freies Formaldehyd in Nanopartikelsuspensionen.....	70
4.3	Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung des mittleren Partikeldurchmessers.....	72
4.3.1	Dynamische Lichtstreuung.....	72
4.3.2	Analytische Ultrazentrifugation.....	74
4.3.2.1	Bestimmung der Größe von PBCA-NP	74
4.3.2.2	Bestimmung der Dichte von PBCA-NP	76
4.3.2.3	Berechnung der molaren Massen der NP	77
4.3.3	Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	78
4.3.4	Raster-Elektronenmikroskopie	79
4.3.5	Raster-Kraft-Mikroskopie	81
4.3.6	Abschließende Bewertung	83
4.4	Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung des mittleren Molekulargewichts der Polymerketten.....	85
4.4.1	Gel-Permeations-Chromatographie	86
4.4.2	MALDI-TOF MS	88
4.4.2.1	Einfluss des pH-Werts auf die chemische Zusammensetzung	91
4.4.2.2	Vergleich Sicomet® – Indermil™	93
4.4.2.3	Einbindung des Stabilisators und des Arzneistoffs in die Polymerstruktur.....	95
4.4.3	Kopplung SEC – MALDI-TOF MS.....	95
4.4.4	Vergleichende Bewertung GPC und MALDI-TOF MS.....	99

4.5	Einfluss der Herstellungsparameter auf die Herstellung von Nanopartikeln durch Emulsionspolymerisation.....	102
4.5.1	Einfluss des Herstellungsvolumens.....	102
4.5.2	Einfluss der Polymerisationszeit.....	103
4.5.3	Einfluss des Neutralisationsverfahrens	104
4.6	Einfluss der Herstellungsparameter auf Doxorubicin-beladene Nanopartikel	105
4.6.1	Partikelgröße.....	106
4.6.2	Polydispersität.....	106
4.6.3	Partikelausbeute	107
4.6.4	Arzneistoffbeladung	108
4.6.5	Abschließende Bewertung	109
4.7	Zetapotential	110
4.7.1	Zetapotential leerer Partikel	110
4.7.2	Zetapotential Doxorubicin-beladener Partikel	111
4.8	Einfluss alternativer Herstellungsverfahren auf die Eigenschaften von PBCA-Nanopartikel	113
4.8.1	Partikelgröße.....	114
4.8.2	Polydispersität.....	114
4.8.3	Partikelausbeute	115
4.8.4	Abschließender Vergleich der verschiedenen Herstellungsverfahren	116
4.8.5	Doxorubicin-beladene PBCA-NP durch Nanopräzipitation.....	116
4.8.6	Leere PBCA-NP durch radikalische Polymerisation.....	117
5	Zellkultur.....	118
5.1	Aufnahme von Phthalocyanin-markierten Nanopartikeln.....	119
5.2	Aufnahme von FITC-Dextran-markierten Nanopartikeln	121
5.3	Aufnahme von Propidiumiodid-markierten Nanopartikeln	122
5.4	Aufnahme von DTAF-Nanopartikeln in Makrophagen	124
5.5	Aufnahme von Rhodamin-6G-Nanopartikeln in Makrophagen	127
5.6	Aufnahme von Rhodamin-6G-Nanopartikeln in CaCo2-Zellen.....	129
5.7	Aufnahme von Rhodamin-123-Nanopartikeln in 9L-Tumorzellen	129
5.8	Aufnahme von Nile Red-Nanopartikeln in Makrophagen.....	132

5.9	Abschließende Bewertung der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel	133
5.10	Aufnahme von freiem Doxorubicin und Doxorubicin-Nanopartikeln in CaCo2-Zellen	137
6	Chemotherapie mit Doxorubicin-Zubereitungen.....	139
6.1	Doxorubicin-Lösungen	140
6.2	Dextran-stabilisierte Doxorubicin-Nanopartikel	142
6.3	Pluronic® F68-stabilisierte DOX-Nanopartikel	143
6.4	Adsorption von Plasmaproteinen an die Nanopartikeloberfläche	145
6.5	Abschließende Bewertung	147
7	Zusammenfassung	149
8	Literatur	154
9	Lebenslauf.....	163
10	Publikationen	164
10.1	Artikel	164
10.2	Posterpräsentationen / Abstracts	164

Verzeichnis der wichtigsten Abkürzungen

AFM	Atomic Force Microscopy (= RKM)
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
BCA	Butylcyanoacrylat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CMT	Carrier-vermittelter Transport
DLS	Dynamische Lichtstreuung (= PCS)
DOX	Doxorubicin
EPR	Enhanced permeation and retention
F68	Pluronic® F68 (= Poloxamer 188)
GC	Gas-Chromatographie
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie (= SEC)
HDL	High-Density-Lipoprotein
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
L61	Pluronic® L61
LDL	Low-Density-Lipoprotein
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight MS
MDR	Multidrug Resistance
MPS	Mononukleäres Phagozyten-System (= RES)
MS	Massenspektrometrie
NP	Nanopartikel
P85	Pluronic® P85
PACA	Polyalkylcyanoacrylat
PBCA	Poly(butylcyanoacrylat)
PCS	Photonen Korrelationsspektroskopie (= DLS)
PD	Polydispersität
PEG	Polyethylenglykol
PGP	P-Glycoprotein
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS80	Polysorbat 80 (= Tween® 80)
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
RES	Retikuloendotheliales System (= MPS)
RKM	Raster-Kraft-Mikroskopie (= AFM)
RMT	Rezeptor-vermittelte Transzytose
SEC	Size-Exclusion Chromatography (= GPC)
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
Upm	Umdrehungen pro Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Die Verwendung von Nanopartikeln (NP) als Arzneistoffträger zur zielgerichteten Pharmakotherapie, dem so genannten Drug Targeting, wird seit mehr als 20 Jahren diskutiert. Für einzelne Trägersysteme konnte bereits eine selektive Anreicherung des Arzneistoffs im Zielgewebe gezeigt werden.

Nanopartikel auf Basis von Poly(butylcyanoacrylat) (PBCA) stellen eine besonders viel versprechende Gruppe an kleinpartikulären Arzneistoffträgern dar. Mit ihrer Hilfe erscheint es möglich die Körperverteilung von Arzneistoffen derart zu modifizieren, dass hohe, pharmakologisch wirksame Konzentrationen der Substanz am Zielort erreicht werden und gleichzeitig eine Verminderung der Nebenwirkungen in den übrigen Organen erzielt wird.

Da sich unmodifizierte PBCA-Nanopartikel in den Organen des retikuloendothelialen Systems (RES) anreichern, können sie für ein Targeting in Leber, Milz, Lunge und Makrophagen genutzt werden (Löbenberg 1996; Suh 1998).

Besonders interessant erscheint die Fähigkeit von oberflächenmodifizierten PBCA-NP Arzneistoffe über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu transportieren (Alyautdin 1997; Kreuter 2002).

Die BHS stellt die Abgrenzung zwischen dem systemisch zirkulierenden Blut und der Interstitialflüssigkeit des Zentralen Nervensystems (ZNS) dar. Ihre Funktion ist der Schutz der empfindlichen Nervenzellen vor Fremdstoffen und Infektionen aus der systemischen Zirkulation.

Die Schutzmechanismen der BHS behindern jedoch auch den Transport von zahlreichen Arzneistoffen in das ZNS. Viele neue Arzneistoffe sind allein aufgrund ihres Unvermögens die BHS zu passieren unwirksam in der Behandlung zentralnervöser Erkrankungen wie etwa Gehirntumoren, HIV, Epilepsie oder Alzheimer.

Für Polysorbat 80-überzogene PBCA-NP konnte gezeigt werden, dass sie den Transport des schlecht hirngängigen Zytostatikums Doxorubicin um den Faktor 60 verbessern (Gulyaev 1999). In einer darauf folgenden experimentellen

Chemotherapie an Glioblastom-tragenden Ratten konnte gezeigt werden, dass Doxorubicin-beladene PBCA-NP bei bis zu 40 % der Ratten zu einer kompletten Remission des Tumors führen (Gelperina 2000; Steiniger 2004).

Der Mechanismus, mit dessen Hilfe diese NP die BHS überwinden, ist nach wie vor nicht endgültig geklärt. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation war die Erforschung des Transportweges der Partikel und des inkorporierten Arzneistoffs über die BHS.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herstellung von leeren und arzneistoffbeladenen NP optimiert. Die gebildeten Arzneistoffträger wurden in Bezug auf Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Molekulargewicht, Ausbeute, Oberflächenladung und Arzneistoffbeladung charakterisiert und ihre intrazelluläre Aufnahme anhand von Zelllinien untersucht. Abschließend erfolgte ein Behandlungsversuch mit optimierten Doxorubicin-haltigen Zubereitungen an Ratten mit intracerebralem Tumor.

Neben der Herstellung, Charakterisierung und Testung der NP lag ein weiterer Schwerpunkt auf der kritischen Betrachtung der verwendeten Charakterisierungsmethoden. Die Ergebnisse klassischer Methoden wie dynamischer Lichtstreuung und Gel-Permeations-Chromatographie wurden mit den Resultaten der analytischen Ultrazentrifugation und Massenspektrometrie verglichen.

2 THEORIE

2.1 Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Das Gehirn gehört zu den am besten geschützten Organen des menschlichen Organismus. Bei allen Wirbeltieren sind, anders als bei anderen Organen, das Zentrale Nervensystem (ZNS) und das Rückenmark von der Blut-Hirn-Schranke (BHS) umgeben. Die BHS stellt die Abgrenzung des systemisch-zirkulierenden Bluts zur Interstitialflüssigkeit, dem Liquor, dar. Diese natürliche Schranke hat den Schutz des empfindlichen zentralen Nervensystems und der dortigen Homöostase zur Aufgabe.

Auf zellulärer Ebene wird die BHS durch die Endothelzellen der Kapillaren des ZNS verkörpert. Die Endothelzellen sind lückenlos durch enge Zell-Zell-Verbindungen, den so genannten tight junctions, miteinander verbunden (siehe Abbildung 1). Diese tight junctions werden durch ein Zusammenspiel von Claudinen, Occludinen und Zonula-Occludens Proteinen gebildet (Wolburg 2002).

Der resultierende dicht geschlossene Zelllayer führt zu einem hohen transendothelialen Widerstand von $1500\text{--}2000\ \Omega\text{cm}^2$, wohingegen andere Gewebe nur einen Widerstand von $3\text{--}33\ \Omega\text{cm}^2$ aufweisen (Misra 2003).

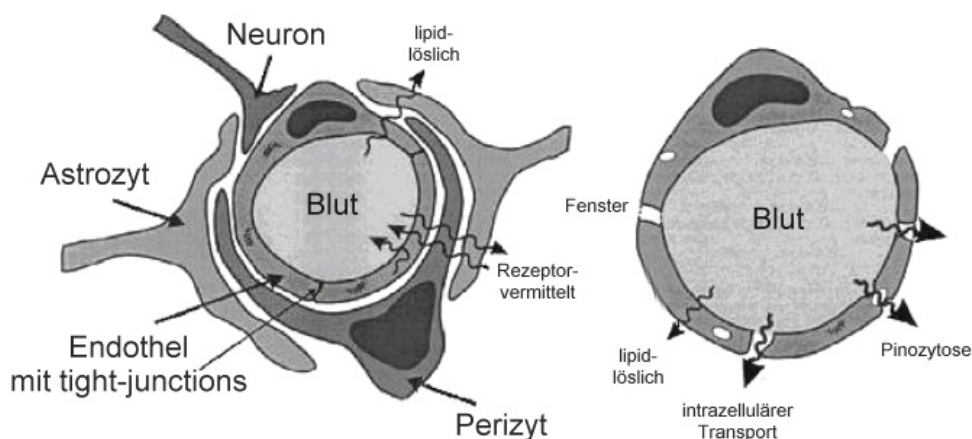


Abbildung 1 - Vergleich zwischen Hirn-Kapillaren und übrigen Kapillargefäßen -
(aus Misra 2003, modifiziert)

Der Transport von Stoffen durch Zellzwischenräume (parazellulärer Transport) und die Aufnahme von flüssigen Substanzen in die Endothelzelle (Pinozytose) sind an der BHS nahezu nicht existent. Daher müssen alle Stoffe, welche die Endothelzellen überwinden wollen, durch die Zelle (transzellulär) transportiert werden.

Nur lipophile Substrate können die Endothelzellmembran durch passive Diffusion überwinden, alle übrigen Stoffe müssen auf anderem Wege aufgenommen werden. Eine Übersicht über die Transportmechanismen an der BHS gibt die nachfolgende Abbildung:

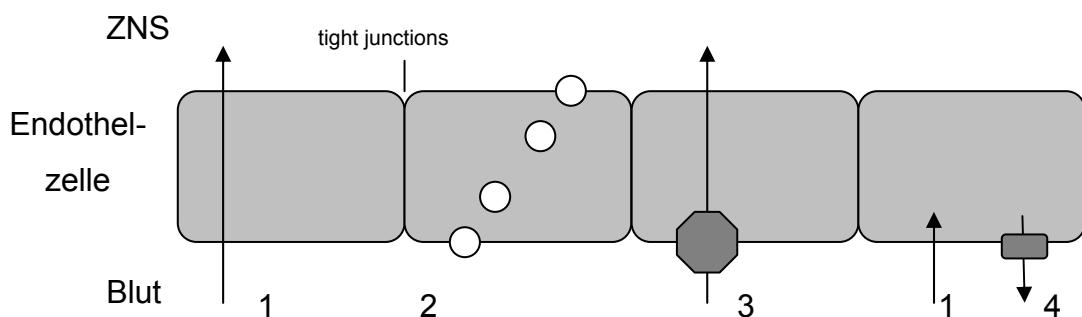


Abbildung 2 - 1) Passive Diffusion, 2) Transzytose, 3) Carrier-vermittelter Transport, 4) Carrier-vermittelter Efflux (z.B. Pgp) - (modifiziert nach Kemper 2004)

Neben der passiven Diffusion stehen die Transzytose und der Carrier-vermittelte Transport als Transportweg zur Verfügung. Kleinere Moleküle wie z.B. Glukose, Aminosäuren und kleinere Peptide, werden über spezifische Transporter über den Carrier-vermittelten Transport aufgenommen, wohingegen größere Stoffe wie z.B. Insulin, Transferrin oder LDL mittels Transzytose in die Endothelzellen und somit ins ZNS gelangen.

Außer den Endothelzellen spielen noch zwei weitere Zelltypen bei der Ausbildung der Schrankenfunktion eine wichtige Rolle: die Astrozyten und die Perizyten. Endothelzelle und Perizyt haben eine gemeinsame Basalmembran. Nahezu auf der gesamten Oberfläche dieser Basallamina lassen sich Astrozyten-Endfüße nachweisen; über diese sezernieren die Astrozyten spezielle Botenstoffe, welche zur Ausbildung der tight junctions führen. Diese Faktoren scheinen essentiellen

Charakter für die Ausbildung der Schrankenfunktion zu besitzen, ihr genaues Zusammenspiel ist allerdings noch weitgehend unklar (Wolburg 1994; Wolburg 2002).

Die Rolle der Perizyten ist bisher ebenfalls nicht endgültig geklärt. Allerdings vermutet man auch hier, dass sie durch Bildung und Abgabe bestimmter Botenstoffe, wie etwa dem Wachstumsfaktor beta (TGF- β), zur Hochregulation der Blut-Hirn-Schrankenfunktion beitragen (Dohgu 2005). Darüber hinaus wird diskutiert, dass die Perizyten über ihre kontraktile Elemente den Blutfluss der Kapillargefäße regulieren (Pardridge 1999).

Neben diesen physikalischen Hindernissen stellt die Blut-Hirn-Schranke auch eine metabolische Barriere dar. In den Mitochondrien der Endothelzellen sind zahlreiche Enzyme aktiv, welche die aufgenommenen Substanzen noch vor dem Weitertransport ins ZNS metabolisieren (Gherzi-Egea 1994; Begley 2004).

Zusätzlich zu den physikalischen und metabolischen Hürden finden sich in den Endothelzellen hohe Konzentrationen an Efflux-Transportern der ABC-Familie (ATP-binding cassette). Das P-Glycoprotein (Pgp, ABCB1) stellt den wichtigsten Transporter dieser Familie dar und ist auf der luminalen Seite der Endothelzellen lokalisiert (siehe Abbildung 2). Dieser Transporter dient zur Entgiftung und entfernt nicht-essentielle Stoffe aus dem ZNS und den Endothelzellen. Bekannte Beispiele für Arzneistoffe, welche Substrate des P-Glycoproteins darstellen, sind Vinka-Alkaloide, Cyclosporin und Doxorubicin. Weitere Transporter mit ähnlicher Funktion sind die multidrug resistance proteins (MRP, ABCC1-12) und der multi-specific organic anion transporter (MOAT, ABCC1) (Terasaki 1999).

Die Präsenz dieser Efflux-Transporter führt dazu, dass einige lipophile Stoffe, welche an sich leicht durch passive Diffusion in die Endothelzelle aufgenommen werden, dort von den Efflux-Transportern erkannt und wieder aktiv aus der Zelle transportiert werden. Diese Eigenschaft der Endothelzellen wird auch als Transport-Barriere der BHS bezeichnet (Begley 2004).

Die Kombination aus physikalischer, metabolischer und Transport-Barriere schützt das ZNS effektiv vor Schädigungen aus der systemischen Zirkulation, aber macht die BHS auch zu einer nahezu unüberwindbaren Hürde für viele Arzneistoffe.

Die Gruppe der zentralnervösen, medikamentös therapierbaren Erkrankungen beschränkt sich auf Depressionen, Schizophrenie, chronische Schmerzen, Migräne, Insomnie und Epilepsie. Für viele ZNS-Erkrankungen wie etwa Alzheimer, Multiple Sklerose¹, Parkinson², Morbus Huntington, Neuro-AIDS und neoplastische Erkrankungen sind kaum hirngängige Arzneistoffe verfügbar (Pardridge 2005).

Neben der Blut-Hirn-Schranke existieren im Körper weitere, ähnliche Transportschranken. Zu nennen sind die Blut-Liquor-Schranke, die Blut-Testes-Schranke und die Blut-Retina-Schranke. An all diesen Schranken findet ein hoch selektiver Stoffaustausch statt.

2.2 Arzneistofftransport über die Blut-Hirn-Schranke

Kleine, ungeladene Moleküle können die BHS in ausreichendem Maß überwinden, wenn sie i) ein Molekulargewicht < 500 Da besitzen und ii) der Arzneistoff weniger als 8 - 10 Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet (Pardridge 2005).

Fast alle aktuell angewandten ZNS-Therapeutika stellen kleine lipophile Moleküle dar, die durch passive Diffusion ins Gehirn gelangen. Allerdings gibt es eine ganze Anzahl an neuen viel versprechenden Arzneistoffen, die ein größeres Molekulargewicht besitzen und daher die BHS nicht passieren können. Auch die Suche nach potenten Arzneistoffen mittels High-Troughput-Screening (HTS) liefert fast ausschließlich Moleküle mit einem Molekulargewicht über 500 Da (z.B. Protease-Inhibitoren, Oligodeoxynucleotide) oder wenig lipophile Arzneistoffe (z.B. kleine Peptide).

Diese größeren und/oder hydrophileren Arzneistoffe können nicht durch passive Diffusion aufgenommen werden, sondern müssen auf andere Weise über die vorhandene Barriere gelangen: Bei der Applikation dieser Substanzen unterscheidet man zwischen den invasiven und den nicht-invasiven Methoden.

¹ Mit Ausnahme von Zytokinen

² Mit Ausnahme von L-DOPA, welches über LAT1 transportiert wird.

2.2.1 Invasive Methoden

Zu den invasiven Methoden zählen die direkte intracerebrale Injektion, Implantation und die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. Alle invasiven Methoden müssen durch einen Spezialisten, wie etwa einem Neurochirurgen, unter zum Teil sehr großem technischem Aufwand durchgeführt werden.

Die direkte intracerebrale Injektion oder die Implantation eignen sich nur zur vereinzelt Anwendung, da bei jeder Applikation Gewebe zerstört wird und die Gefahr einer intracerebralen Infektion besteht. Beiden Methoden ist ebenfalls gemein, dass die Reichweite des so applizierten Arzneistoffs stark eingeschränkt ist. Die Diffusion des lokal applizierten Stoffs im ZNS nimmt im Quadrat zum Abstand von der Applikationsstelle ab; der maximale Diffusionsweg liegt unter 1 mm (Pardridge 1998).

Bei der Öffnung der BHS (Blood-Brain Barrier Disruption) werden Substanzen in die Carotisarterie verabreicht, die zu einer temporären Aufhebung der Schrankenfunktion führen. So führt z.B. die Anwendung von hyperosmolaren Mannitol-Lösungen zu einem „Schrumpfen“ der Endothelzellen, einer Öffnung der tight junctions und ermöglicht so den parazellulären Transport des Arzneistoffs. Allerdings handelt es sich hierbei um eine unspezifische Öffnung der BHS für alle Substanzen für einen Zeitraum von ca. 20 – 30 Minuten. Auch Toxine und Neurotransmitter aus der systemischen Zirkulation können in dieser Zeit ins ZNS gelangen und zu Zellschädigungen und Infektionen führen (Rapoport 2000).

Neben Mannitol werden Histamin, Bradykinin und Bradykinin-Analoga zur Öffnung der BHS eingesetzt. Der Mechanismus auf dem die Wirkung dieser Substanzen beruht ist noch nicht endgültig geklärt, scheint jedoch durch Bindung der Substanzen an einen spezifischen Rezeptor zu Stande zu kommen (Miller 2002).

Eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke durch organische Lösungsmittel wie Ethanol und Dimethylsulfoxid (DMSO) oder durch Emulgatoren wie z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS), Polysorbat 80 und Alkylglycerole wird ebenfalls diskutiert. Man vermutet, dass diese Stoffe zu einer Störung der Membranfunktion der Endothelzellen führen, welche den Transport von Stoffen ins ZNS ermöglicht (Pardridge 2005).

2.2.2 Nicht-Invasive Methoden

2.2.2.1 Lipophile Prodrugs / Wirkstoffanaloga

Eine nicht-invasive Möglichkeit die Diffusion von Arzneistoffen ins ZNS zu erhöhen ist die Synthese von lipophileren Prodrugs bzw. Wirkstoffanaloga. Diese Moleküle mit erhöhter Lipid-Löslichkeit können durch passive Diffusion in die Endothelzellen aufgenommen werden.

Eines der bekanntesten Beispiele hierfür ist das Heroin, das Diacetyl-Derivat des Morphins, welches über 30 mal besser in das Gehirn gelangt, als die Ursprungssubstanz (Oldendorf 1972).

Vorraussetzung für diesen Ansatz ist ein geringes Molekulargewicht. Auch nach Modifikation des Ursprungsmoleküls sollte das Molekulargewicht unter der Schwelle von 500 Da liegen. Leider besitzen die meisten neuen, durch High-Throughput-Screening (HTS) gefundenen Arzneistoffe per se bereits ein deutlich höheres Molekulargewicht.

Ein weiteres Problem dieses Ansatzes ist, dass mit zunehmender Lipid-Löslichkeit die Plasmalöslichkeit der Substanz ab- und die Albumin-Eiweiß-Bindung der Substanz zunimmt; auch ist die Aufnahme der Substanz in andere Nicht-Ziel-Organe erhöht. Es erscheint schwierig die Balance zwischen ausreichender Löslichkeit der Substanz im Blut und genügender Lipophilie zu finden, ohne die Pharmakokinetik mehr als erwünscht zu verändern (Pardridge 1998; Misra 2003).

Eine Weiterentwicklung des Prodrug-Prinzips stellt die Formulierung von gezielten Prodrugs (Targeted Prodrugs) dar. Hier will man in erster Linie nicht die Lipophilie erhöhen, sondern modifiziert die Molekülstruktur derart, dass die Affinität zu bestimmten Transportern oder Rezeptoren erhöht ist und die Arzneistoffe durch Carrier-vermittelten Transport oder Transzytose aufgenommen werden.

Es ist möglich ein Targeting-Molekül, wie z.B. einen Antikörper, an den Arzneistoff zu binden und so genannte „chimäre Moleküle“ zu bilden. Der Antikörper bindet nach Applikation an seine spezifische Bindungsstelle auf der Zielzellmembran und führt zur Rezeptor-vermittelten Transzytose (vgl. 2.2.2.3) der Substanz (Pardridge 2002).

Pardridge et al. konnten zeigen, dass Biotin, welches über Avidin an den monoklonalen Antikörper OX-26 (AK gegen den Transferrin Rezeptor) gebunden ist, ins ZNS aufgenommen wird (Yoshikawa 1992).

2.2.2.2 Carrier-vermittelter Transport

Bestimmte Nährstoffe, wie z.B. Glukose und Aminosäuren werden über spezifische Transporter in das Gehirn aufgenommen; man spricht vom Carrier-vermitteltem Transport (CVT) oder Carrier-vermittelter Diffusion. Die hier beteiligten Transporter weisen eine hohe Substratspezifität auf und der Transport ist auf Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 500 - 600 Dalton beschränkt.

Abgesehen von diesen Einschränkungen erscheint es möglich auch Arzneistoffe über CVT in das Gehirn zu befördern. Bei den Transportern unterscheidet man (Tamai 2000; Misra 2003):

- (1) Aminosäure-Transporter
 - a. für anionische Aminosäuren
 - b. für kationische Aminosäuren
 - c. für neutrale Aminosäuren
- (2) Transporter für Monocarbonsäuren (Milchsäure, Essigsäure, Ketonkörper)
- (3) Transporter für kationische Arzneistoffe
- (4) Hexose (Glukose)-Transporter
- (5) Nukleosid-Transporter
- (6) Peptid-Transporter
- (7) Efflux-Transporter

Ein bekanntes Beispiel für einen Stoff, der über Carrier-vermittelten Transport aufgenommen wird, ist L-DOPA, eine Vorstufe des Neurotransmitters Dopamin. Dopamin selbst kann die BHS nicht überwinden, L-DOPA wird jedoch selektiv über den Aminosäure-Transporter für neutrale Aminosäuren (System L) in die Endothelzellen aufgenommen und gelangt so in das ZNS, wo es in Dopamin umgewandelt wird (Mutschler 2001).

Neben L-DOPA transportiert dieses System auch andere Moleküle, die eine Carbonsäurefunktion mit benachbarter Aminogruppe besitzen. So werden unter anderem die Arzneistoffe Baclofen und Gabapentin auf diesem Weg ins ZNS aufgenommen (Begley 2004; Tsuji 2005).

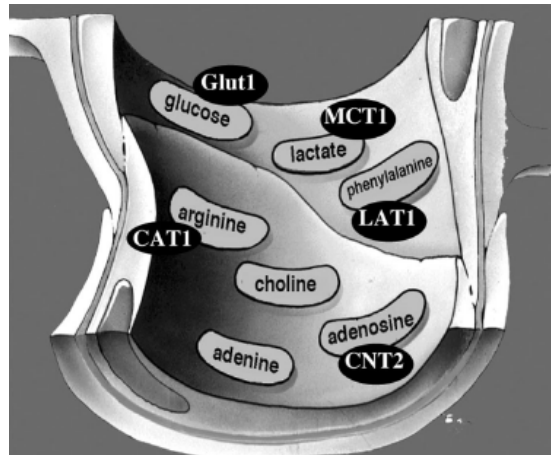


Abbildung 3 - Carrier-vermittelter Transport an der BBB - (aus Pardridge 2005)

GLUT1 = glucose transporter typ 1, MCT = monocarboxylic acid transporter typ 1, LAT = large neutral amino acid transporter typ 1, CAT1 = cationic amino acid transporter typ 1, CNT = concentrative nucleoside transporter type 2

Die bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnten Efflux-Transporter Pgp, MRP und MOAT stellen kein Target für den Arzneistofftransport dar; ihre Existenz sollte aber berücksichtigt werden, da sie einen intrazellulär aufgenommenen Arzneistoff wieder aktiv aus der Endothelzelle heraus transportieren könnten.

2.2.2.3 Rezeptor-vermittelte Transzytose

Neben den spezifischen Transporter-Systemen des Carrier-vermittelten Transports, welcher in erster Linie Verantwortung für den Transport von kleineren Substraten trägt, ist auch die Transzytose von Stoffen an der BHS von großer Bedeutung. Man unterscheidet zwischen der Adsorptionsvermittelten Transzytose und der Rezeptor-vermittelten Transzytose (Misra 2003; Begley 2004).

Durch Adsorptionsvermittelte Transzytose werden in erster Linie größere, kationische Stoffe aufgenommen. Diese lagern sich aufgrund ihrer positiven Ladung an die negativ geladene Zellmembran der Endothelzellen an und werden daraufhin internalisiert.

Mittels Rezeptor-vermittelter Transzytose werden unter anderem Stoffe wie Transferrin, Insulin und das Low-Density-Lipoprotein (LDL) in das ZNS aufgenommen. Hierbei bindet das Substrat an seinen Rezeptor, der Substrat-Rezeptor-Komplex wird internalisiert und - im Idealfall - innerhalb weniger Minuten in die Interstitialflüssigkeit des ZNS exozytiert (Pardridge 1999).

Man unterscheidet bei den Transportsystemen der Rezeptor-vermittelten Transzytose zwischen Rezeptoren, die auf der luminalen, der abluminalen oder auf beiden Seiten der Endothelzellmembran zu finden sind.

Ein Beispiel für einen Rezeptor, der nur auf der luminalen Seite lokalisiert ist, stellt der Scavenger-Rezeptor dar, mit dessen Hilfe acetyliertes Low-Density-Lipoprotein aus dem Blut in die Endothelzellen aufgenommen wird. Der Transferrin-Rezeptor ist ein Beispiel für einen Rezeptor, welcher auf beiden Membranseiten exprimiert ist. Er vermittelt den Transport von Transferrin in die Richtungen Blut-Gehirn und Gehirn-Blut (Pardridge 2002; De Boer 2003).

Für den Arzneistofftransport erscheint die Rezeptor-vermittelte Transzytose interessant, da es möglich ist größere Moleküle oder sogar ganze Trägersysteme, wie etwa Nanopartikel, auf diesem Weg in die Endothelzellen bzw. in das ZNS zu bringen. Allerdings werden nicht alle aufgenommenen Vesikel nach ihrer Endozytose wieder auf der abluminalen Seite abgegeben. Es besteht die Gefahr, dass der arzneistoffbeladene Vesikel in der Endothelzelle mit einem Lysosom verschmilzt und abgebaut wird.

2.3 Partikuläre Trägersysteme

Bei den partikulären Trägersystemen unterscheidet man zwischen den Liposomen, Nanopartikeln und festen Lipidnanopartikeln (SLN). Alle drei Systeme stellen viel versprechende Arzneistoffträger für das Drug Targeting dar und besitzen eine Größe im Nanometerbereich ($< 1 \mu\text{m}$).

Ein ideales partikuläres Trägersystem sollte die nachfolgenden Bedingungen erfüllen:

1. kontrollierte, lang anhaltende Freisetzung im Zielgewebe
2. nicht toxisch, nicht immunogen
3. chemisch und physikalisch stabil
4. biodegradierbar
5. steril
6. günstige und einfache Herstellung

Nanopartikel auf Basis von Poly(butylcyanoacrylat) erfüllen einen Großteil der oben genannten Anforderungen. Sie sind einfach und kostengünstig unter aseptischen Bedingungen herzustellen, besitzen eine gute Lagerungsstabilität (Sommerfeld 2000), sind leicht biodegradierbar (Gislain 1983; Vauthier 2003), nicht immunogen und zeigen keine akute Toxizität (Kante 1982). Für einige Arzneistoffe konnte eine gezielte Freisetzung gezeigt werden (siehe auch 2.3.1.2).

2.3.1 Nanopartikel (NP)

Nanopartikel sind feste, kolloidale Partikel, welche aus Polymeren oder Lipiden hergestellt werden können; sie besitzen eine Größe im Bereich zwischen 10 und 1000 nm (Kreuter 1983).

Diese Größe ermöglicht eine problemlose intravenöse Applikation der NP, da die kleinsten Kapillargefäße des menschlichen Organismus einen mittleren Durchmesser von 3 - 8 μm besitzen.

NP sollen Arzneistoffe gezielt an ihren Wirkort bringen oder dienen zu diagnostischen Zwecken. Sie können aus künstlichen oder nativen Polymeren bestehen. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Polymere, welche in der Pharmazeutischen Technologie häufig Verwendung finden:

Tabelle 1 - Häufig verwendete Polymere in der Nanopartikelherstellung

Native Polymere	
Humanes Serum Albumin (HSA)	(Langer 2000 ; Langer 2003)
Gelatine	(Coester 2000; Balthasar 2005)
Chitosan	(Mansouri 2004)
Synthetische Polymere	
Poly(methylmetacrylat) (PMMA)	(Kreuter 1976; Tröster 1990)
Polymilchsäure (PLA)	(Anderson 1997)
Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA)	(Anderson 1997)
Poly(alkylcyanoacrylat) (PACA)	(Couvreur 1979; Kreuter 1983)

Seit Beginn der Forschung im Bereich der Nanopartikel sind zahlreiche Herstellungsverfahren entwickelt und beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit können nicht alle Verfahren vorgestellt werden.

Die wichtigsten Herstellungsverfahren sind:

1. Emulsionspolymerisation (Emulsion Polymerization)
 - a. radikalische Emulsionspolymerisation
 - b. anionische Emulsionspolymerisation
2. Grenzflächenpolymerisation (Interfacial Polymerization)
3. Lösungsmittelverdampfungsverfahren (Solvent Evaporation)

Weitere Verfahren finden sich unter anderem in den Arbeiten von Kreuter und Allemann (Kreuter 1983; Allemann 1993).

Im Vergleich zu einer intravenös (i.v.) applizierten Arzneistofflösung besitzen diese ultrafeinen Arzneistoffträger zahlreiche Vorteile: (i) Schutz des Arzneistoffs vor Abbau, (ii) Möglichkeit des Drug Targetings, (iii) verminderte unerwünschte Arzneimittelwirkungen und (iiii) eine verzögerte Wirkstofffreisetzung.

Ihre Vorteile gegenüber Liposomen, welche auch als kolloidales Trägersystem Anwendung finden, liegen in der geringen Anzahl an benötigten Hilfsstoffen während der Produktion, der meist unkomplizierten Herstellung und ihrer großen physikalischen Stabilität (Olivier 2005).

Der Arzneistoff kann (A) an die Oberfläche adsorbiert, (B) in Form einer festen Lösung/Dispersion in die Polymermatrix eingeschlossen, (C) durch das Polymer verkapselt oder (D) kovalent gebunden vorliegen (Kreuter 2002).

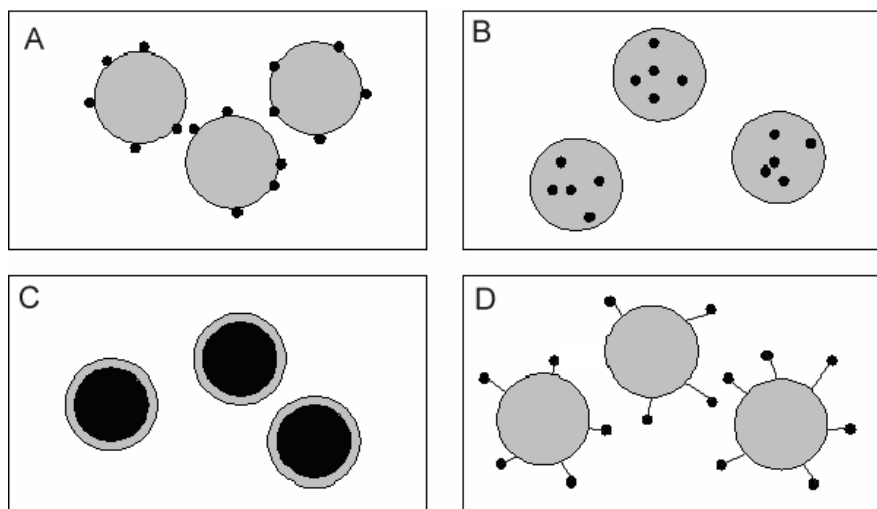


Abbildung 4 - Möglichkeiten der Arzneistoffeinbindung in NP: (A) adsorptiv an Oberfläche gebunden, (B) als feste Lösung/Dispersion, (C) verkapselt oder (D) kovalent gebunden

Die Beladung der NP mit Arzneistoff kann während oder nach der Herstellung geschehen. Werden zunächst leere Partikel hergestellt und der Arzneistoff erst später als Lösung zugegeben, so wird der Arzneistoff lediglich adsorptiv an der Oberfläche gebunden (A). Ist der Wirkstoff bereits während der Nanopartikelherstellung zugegen, so erhält man Partikel, welche den Wirkstoff als feste Lösung oder feste Dispersion eingeschlossen haben (B).

Die Typen C und D stellen Spezialformen der bereits genannten Möglichkeiten dar: Wenn der gesamte Arzneistoff von einer Polymerhülle umschlossen ist, spricht man auch von Nanokapseln (C). In diesem Fall ist der Arzneistoff besonders effektiv vor enzymatischem Abbau geschützt und es lassen sich sehr hohe Arzneistoffbeladungen realisieren.

Die kovalente Bindung des Arzneistoffs an die Polymermatrix (D) erfolgt häufig mit Hilfe von Platzhaltern, so genannter Spacer, die zwischen Polymer und Arzneistoff gesetzt werden. Hierfür werden vor allem Polyethylenglykole (PEG) verschiedener Kettenlänge eingesetzt.

Da nur der freie Wirkstoff pharmakologisch aktiv ist, ist zu beachten, dass die Bindung zwischen Wirkstoff und Polymer bzw. Spacer am Zielort (z.B. enzymatisch oder reduktiv) gespalten werden kann.

Das erste und einzige bisher zugelassene nanopartikuläre Fertigarzneimittel ist AbraxaneTM von Abraxis Oncology (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, USA). Das Zytostatikum Paclitaxel ist hier an Albumin-NP gebunden und kann so ohne die Verwendung der sonst notwendigen Cosolventien und Emulgatoren appliziert werden (Desai 1999; Damascelli 2001; Desai 2004).

2.3.1.1 Gezielte Arzneistofftherapie (Drug Targeting) mit Nanopartikeln

Bereits Ende des 18. Jahrhunderts entwickelte Paul Ehrlich das Konzept der zielgerichteten Arzneistofftherapie. Ehrlich hatte die Idee eine Art „Zauberkegel“ zu entwickeln, die gezielt die erkrankten Zellen erkennt und abtötet, ohne die gesunden Zellen zu schädigen.

Eine Art „Zauberkegel“ stellen die hier verwendeten Nanopartikel dar. NP werden nach intravenöser Applikation sehr schnell mit Lipoproteinen des Bluts überzogen, opsoniert und von den Organen und Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) aufgenommen. Vor allem lipophile Trägersysteme werden bevorzugt von Leber, Milz und Lunge aufgenommen, während hydrophile Partikel eine deutlich geringere Anreicherung in diesen Organen zeigen.

Dieses primäre Verteilungsmuster von lipophilen NP wurde bereits zum Targeting von Azidothymidin (AZT) in Makrophagen genutzt (Löbenberg 1996).

Eine weitere Eigenschaft der NP ist, dass sie Blutgefäße an fenestrierten Stellen des Endothels verlassen können und sich so in bestimmten Geweben anreichern. Bei Tumorgefäßen führt die schnelle Vaskularisierung zur Ausbildung von lückenhaften

und stark fenestrierten Gefäßen. Dies bedingt, dass sich intravenös applizierte NP in diesen Bereichen verstärkt anreichern (Grislain 1983). Man bezeichnet diese Eigenschaft von NP auch als „Enhanced Permeation and Retention Effect“ (EPR-Effekt) (Matsumura 1986; Kreuter 2001).

Die beiden oben erwähnten Körperverteilungen der Nanopartikel beruhen allein auf deren physikochemischen Eigenschaften. Daher wird diese Art des Drug Targeting auch als passives Targeting bezeichnet.

Eine Möglichkeit dieses originäre Verteilungsmuster zu ändern, besteht in der Oberflächenmodifikation der eingesetzten NP. Überzieht man die NP vor ihrer Applikation mit bestimmten Emulgatoren („Coating von NP“), wie z.B. Polysorbat 80, Poloxamin 908, so ist die Aufnahme in Makrophagen und andere Organe des RES deutlich herabgesetzt (Tröster 1990; Borchard 1994; Araujo 1999). Eine andere Möglichkeit die Oberfläche zu modifizieren und die Hydrophilie der Partikel zu erhöhen und somit die Aufnahme in das phagozytierende System zu minimieren, ist die Modifikation der Partikeloberfläche mit Polyethylenglykol-Ketten (PEG). Partikel mit einer minimierten Aufnahme in das RES zeigen einen so genannten „Stealth Effect“ (Peracchia 1997b; Brigger 2004).

Eine gezielte Anlagerung der Nanopartikel an Tumorzellen kann durch die Bindung von Tumor-spezifischen Molekülen an die Partikeloberfläche bewerkstelligt werden. Durch die Bindung von Antikörpern an die Nanopartikeloberfläche kann eine deutliche Steigerung der Selektivität erzielt werden. Wartlick et al. konnten zeigen, dass Albumin-NP, welche an ihrer Oberfläche einen Antikörper gegen das Tumorantigen HER2 tragen, eine verstärkte Anreicherung in den Tumorzellen zeigen. (Wartlick 2004).

Die geänderte Körperverteilung aufgrund einer modifizierten Nanopartikelstruktur wird als aktives Targeting bezeichnet.

2.3.1.2 Poly(butylcyanoacrylat)-Nanopartikel (PBCA-NP)

Die Gruppe der synthetischen Polyalkylcyanoacrylate (PACA) stellt eine viel versprechende Grundlage für die Darstellung von NP dar. Diese Arbeit verwendet Nanopartikel auf Basis von Poly(butylcyanoacrylat) (PBCA).

Anionische Emulsionspolymerisation

Dieses Polymer kann durch anionische Emulsionspolymerisation von Butylcyanoacrylat (BCA) in Wasser bei niedrigem pH (pH 1-4) und der Anwesenheit von Stabilisatoren (z.B. Dextran 70.000, Pluronic® F68) gewonnen werden (Couvreux 1979).

Nach Zugabe des schlecht wasserlöslichen BCA zur wässrigen Tensidlösung liegt der Großteil der Monomermoleküle als Monomertröpfchen vor; nur ein kleiner Teil des BCA ist gelöst.

Die Polymerisation wird in der wässrigen Phase durch Anlagerung eines Hydroxid-Ions (OH^-) an die stark aktivierte Doppelbindung des Monomers gestartet und setzt sich durch Addition eines weiteren Monomers fort. Es kommt zu einer linearen Kettenverlängerung durch Addition weiterer Monomere, bis die Reaktion durch die Addition eines Protons (H^+) gestoppt wird. Während der Polymerisation in der wässrigen Phase werden aus den Monomertröpfchen kontinuierlich neue Monomermoleküle freigesetzt; die Tröpfchen dienen quasi als Reservoir für BCA (Kreuter 1994). Die resultierenden Polymerketten sind, wie das Monomer, nicht in Wasser löslich und aggregieren zu Nanopartikeln. Der niedrige pH-Wert des Mediums ist wichtig, um eine kontrollierte Polymerisation des Monomers zu gewährleisten, da die Reaktion mit steigendem pH schneller und letztlich unkontrollierter abläuft.

Da es sich bei Dextran 70.000 um keinen Emulgator handelt, wird diese Form der Polymerisation in der Literatur auch als Dispersionspolymerisation beschrieben (Reddy 2004a). In dieser Arbeit wird jedoch durchweg der Begriff Emulsionspolymerisation verwendet.

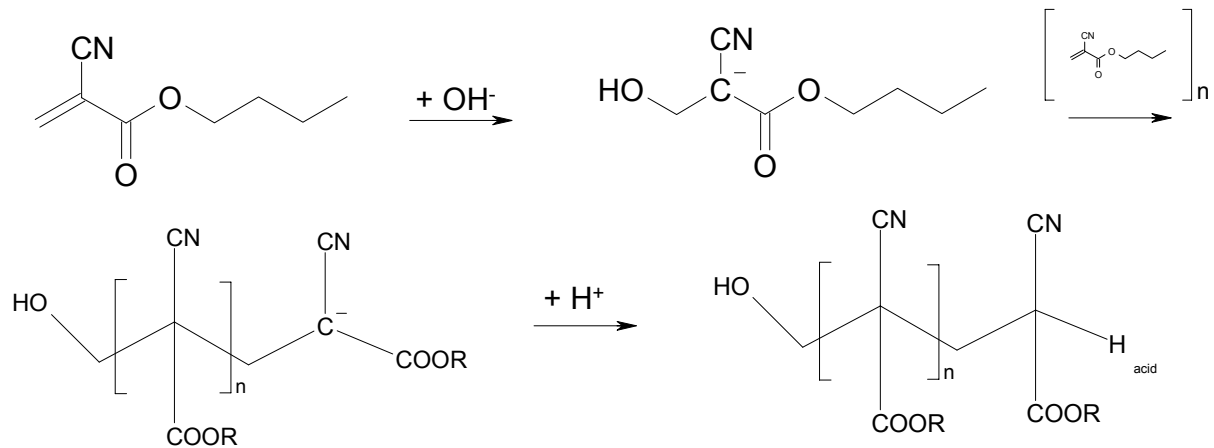


Abbildung 5 - Reaktionsmechanismus der anionischen Emulsionspolymerisation von BCA zu PBCA
 $\text{R} = \text{C}_4\text{H}_9$

Alternative Herstellungsmethoden für Nanopartikel, welche auf PBCA basieren, sind die radikalische Polymerisation, die Grenzflächenpolymerisation und die Nanopräzipitation.

Radikalische Emulsionspolymerisation

Die radikalische Polymerisation von BCA ähnelt der anionischen Emulsionspolymerisation. Auch hier bilden sich nach Zugabe des Monomers zum wässrigen Polymerisationsmedium zunächst Monomertröpfchen aus, die einzelne gelöste BCA Moleküle freisetzen. Im Unterschied zur anionischen Emulsionspolymerisation wird die Reaktion in diesem Fall jedoch nicht durch Hydroxid-Ionen gestartet, sondern beginnt mit der Anlagerung eines Radikals an die stark aktivierte Doppelbindung des Butylcyanoacrylat. Als radikalischer Starter kann z.B. Ammonium-Cer(IV)-nitrat verwendet werden.

Grenzflächenpolymerisation

Bei der Grenzflächenpolymerisation wird das Monomer zusammen mit dem lipophilen Arzneistoff in einer Mischung aus Öl und Ethanol gelöst und langsam in eine wässrige, saure Tensidlösung eingebracht. Daraufhin kommt es zu einer durch Hydroxid-Ionen initiierten Polymerisation des Monomers an der Grenzfläche zwischen Öl und Wasser. Das Resultat sind Nanokapseln, bei denen der im Öl gelöste Arzneistoff von einer Polymerhülle umgeben ist.

Nanopräzipitation

Bei der Nanopräzipitation wird das vorgeformte Polymer (PBCA) in Aceton oder einem anderen flüchtigen Lösungsmittel gelöst und zu einer wässrigen, neutralen Tensidlösung gegeben. Da PBCA wasserunlöslich ist, kommt es zu einer spontanen Ausbildung von Nanopartikeln. Das leicht flüchtige Aceton kann durch Evaporation entfernt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Partikel durch Emulsionspolymerisation, radikalische Polymerisation und Nanopräzipitation hergestellt.

Die Oberfläche der so synthetisierten Nanopartikel kann weitergehend modifiziert werden, um die Aufnahme des Trägersystems in das RES zu vermindern und die Anreicherung im ZNS zu erhöhen (Tröster 1990; Borchard 1994; Araujo 1999). Am häufigsten und erfolgreichsten wurde bisher die Modifikation mit Polysorbat 80 eingesetzt. Hierbei werden die fertigen Partikel eine halbe Stunde vor ihrer Applikation in einer 1 % Lösung von Polysorbat 80 inkubiert und auf diesem Weg mit einer Tensidhülle überzogen („gecoated“); hierdurch erscheinen sie deutlich hydrophiler und werden in einem geringeren Maße opsoniert und phagozytiert. Neben der geringeren Anreicherung im RES zeigten diese Partikel auch eine erhöhte Konzentration in den Zielorganen. Weitere viel versprechende Tenside sind Pluronic® F68 und Poloxamin 908.

Einen anderen Ansatz stellt die Synthese eines PEG-PACA-Copolymers dar. Mit Hilfe dieses Copolymers lassen sich NP herstellen, welche an ihrer Oberfläche kovalent gebundenen PEG-Ketten tragen und eine verlängerte Plasmahalbwertszeit zeigen (Peracchia 1997a; Peracchia 1999; Brigger 2004).

Der Transport ins ZNS mit Hilfe von Polysorbat 80-überzogenen PBCA-NP wurde bereits für die folgenden Arzneistoffe gezeigt: Dalargin (Kreuter 1995), Loperamid (Alyautdin 1997), Kytorphin (Schröder 1998), Amitryptilin (Schröder 1998), Tubocurarin (Alyautdin 1998), Doxorubicin (Gulyaev 1999) und die neuen NMDA-Rezeptor-Antagonisten MRZ 2/576 und MRZ 2/596 (Fries 2000).

Der Mechanismus, mit dessen Hilfe diese modifizierten NP den Arzneistoff zu einem höheren Ausmaß in das ZNS transportieren, ist noch nicht endgültig geklärt. Es sind folgende Mechanismen denkbar (modifiziert nach Kreuter, 2002):

1. Die NP binden an die Endothelzellen auf der luminalen Seite der Hirnkapillaren und geben den Arzneistoff hier frei. Dadurch kommt es zu einem großen Konzentrationsgradienten an Arzneistoff und der freie Arzneistoff wird auf dem Wege der Diffusion aufgenommen.
2. Die NP werden mittels Rezeptor-vermittelter Transzytose aufgenommen. Der Arzneistoff wird in der Endothelzelle freigesetzt und in freier Form weiter ins ZNS transportiert.
3. Die NP werden durch Rezeptor-vermittelte Transzytose durch die Endothelzellen transportiert.
4. Die NP führen zu einer Öffnung der Tight Junctions. Das Trägersystem kann parazellulär die BHS überwinden.
5. Das verwendete Tensid verursacht eine Störung der Endothelzellmembran und führt so zu einer gesteigerten, unspezifischen Aufnahme von Substanzen in die Endothelzellen.
6. Das Tensid oder Polymer führt zu einer Hemmung der Efflux-Transporter an der BHS.

Lück et al. konnten zeigen, dass Polysorbat 80-überzogene NP während ihrer Passage im Blut große Mengen an Apolipoproteinen adsorbieren. Man vermutet, dass die NP durch die adsorbierten Apolipoproteine (in erster Linie ApoE, ApoB) an den Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Rezeptoren der Blut-Hirn-Schranke LDL-Partikel vortäuschen und somit auf dem Wege der Rezeptor-vermittelten Transzytose internalisiert werden (Lück 1997; Kreuter 2002).

Allerdings weisen jüngste Ergebnisse mit ApoE-modifizierten Albumin-NP darauf hin, dass diese Partikel nicht über den LDL-Rezeptor aufgenommen werden. Die Beteiligung eines anderen Lipoproteinrezeptors ist jedoch denkbar (Schwedat 2006). Es erscheint wahrscheinlich, dass eine Kombination der oben genannten Mechanismen zum Transport des Arzneistoffs über die BHS führt.

Um das Schicksal der Nanopartikel in oder an der Blut-Hirn-Schranke aufzuklären, sollten im Rahmen dieser Arbeit fluoreszenzmarkierte, elektronendichte PBCA-NP entwickelt werden, welche sich mit gängigen Verfahren wie konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) nachweisen lassen.

2.3.1.3 Fluoreszenzmarkierte Nanopartikel

Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein wichtiges Werkzeug um die intrazelluläre Lokalisation von Zellorganellen, bestimmten Proteinen oder eingebrachten Arzneistoffen zu detektieren. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens stellt die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) dar. Während bei der „konventionellen“ Mikroskopie neben dem emittierten Licht aus der Fokusebene auch die Photonen der darunter und darüber liegenden Schichten zum Bild beitragen, ist es bei der CLSM möglich einen einzelnen Punkt des Objekts zu fokussieren. Um mehr als einen Bildpunkt zu detektieren, kann das Objekt mit Hilfe eines Scanspiegels abgetastet („gescannt“) werden. Das Gesamtbild wird mit Hilfe eines PCs dargestellt. Durch das Abtasten mehrerer z-Ebenen ist es möglich ein dreidimensionales Bild des Objekts anzufertigen (Paddock 1999; Lamprecht 2002; Roderfeld 2003).

Die Fluoreszenzmarkierung kann auf unterschiedlichste Weise erfolgen: Es können fluoreszierende Proteine, fluoreszenzmarkierte Antikörper oder andere fluorogene Verbindungen eingesetzt werden. Um die Zellmembran zu markieren, werden häufig Konjugate aus lipophilen Verbindungen und einem Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt (z.B. Alexa 647-Concanavalin A).

Im vorliegenden Fall soll das intrazelluläre Schicksal der PBCA-NP untersucht werden. Die Fluoreszenzmarkierung des Trägersystems muss mehrere Bedingungen erfüllen: (i) Der eingesetzte Marker sollte die physikochemischen Eigenschaften des Trägersystems nicht verändern. (ii) Der Marker sollte alleine nicht zellmembrangängig sein und möglichst fest (im Idealfall: kovalent) an den Partikel

binden. (iii) Der Fluoreszenzfarbstoff sollte sein Anregungsmaximum in der Nähe der verwendeten Anregungswellenlängen der eingesetzten Laser haben.

Insbesondere bei kleineren Molekülen kann deren Fluoreszenzmarkierung zu einer erheblichen Veränderung der Eigenschaften führen, da es sich bei allen Fluoreszenzfarbstoffen um relativ lipophile und große ($M_r > 400$ g/mol) Moleküle handelt. So konnte Bingaman et al. zeigen, dass wichtige Parameter (Größe, Ladung) von bovinem Serumalbumin (BSA) durch Konjugation mit FITC verändert werden (Bingaman 2003).

Die Lipophilie und die Größe des Markers stellt bei der Markierung der Nanopartikel ein eher kleines Problem dar. Allerdings kann die Bindung des Farbstoffs an die NP zu einer Veränderung der Partikeloberfläche und deren Eigenschaften (z.B. Zetapotential) führen.

Im Idealfall ist der Marker kovalent an die Nanopartikel-Matrix gebunden, um sicherzustellen, dass nicht bereits vor der Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen Farbstoff freigesetzt wird und in freier Form in die Zellen gelangt. Es ist bekannt, dass adsorptiv gebundene Fluoreszenzmarker bei Aufnahmestudien zum Teil bereits extrazellulär freigegeben werden und aufgrund ihrer hohen Lipophilie in freier Form die Zellmembran überwinden können. Intrazellulär akkumulieren diese Marker in den lipophilen Kompartimenten und täuschen Nanopartikel vor (Suh 1998; Pietzonka 2002).

2.3.2 Liposomen

Liposomen werden bereits seit vielen Jahren als Arzneistoff- und Kosmetikaträger genutzt. Liposomen sind Partikel, welche von einer ein- oder mehrschichtigen Phospholipid-Doppelmembran umgeben sind und eine innere wässrige Phase besitzen, welche mit hydrophilem Wirkstoff beladen werden kann. Ähnlich wie PBCA-NP besitzen die leeren Trägersysteme eine geringe Toxizität und sind biodegradierbar. Insbesondere von liposomalen Zytostatika versprach man sich eine zielgerichtete Wirkung bei geringeren Nebenwirkungen. Allerdings werden die älteren, „konventionellen“ Liposomen sehr schnell vom RES aufgenommen und besitzen daher eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit (Schnyder 2005).

Die Entwicklung von sterisch stabilisierten (stealth[®]) Liposomen durch die PEGylierung der Oberfläche führte zu einer deutlich geringeren Aufnahme in das RES und zu einer längeren Halbwertszeit. Diese modifizierten Liposomen finden sich bereits als Arzneistoffträger in einigen Fertigarzneimitteln, wie z.B. in Caelyx[®], einer liposomalen Doxorubicin-Zubereitung (Essex Pharma 2005). In der klinischen Praxis wird dieses Fertigarzneimittel zum Teil auch zur Behandlung von Glioblastomen eingesetzt (Hau 2004).

Aktuelle Forschungsprojekte auf dem Gebiet der Liposomen beschäftigen sich unter anderem mit deren Oberflächenmodifikation. Durch Konjugation von Antikörpern soll die Anreicherung des Trägersystems am Wirkort weiter erhöht werden. Huwyler et al. entwickelten Liposomen, welche einen Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor (OX26) tragen und konnten einen Transport dieser Trägersysteme durch Endothelzellen zeigen (Cerletti 2000).

Weitere Informationen zu Liposomen finden sich in den Übersichtsarbeiten von Schnyder, Torchilin und Visser (Schnyder 2005; Torchilin 2005; Visser 2005).

2.3.3 Feste Lipidnanopartikel

Die festen Lipidnanopartikel, welche im Englischen auch als Solid Lipid Nanoparticles (SLN) bezeichnet werden, stellen eine Sonderform der Nanopartikel dar. Ihre Herstellung wurde erstmals 1991 von Eldem und Speiser beschrieben, welche die SLN über die Sprühtrocknung von Emulsionen erzeugten (Eldem 1991). Heute werden diese Systeme oftmals durch Hochdruckhomogenisation hergestellt (Lucks 1992; Diederichs 1998).

Die wesentlichen Vorteile liegen in der Möglichkeit der Large Scale-Produktion und der relativ einfachen Herstellung mit einem Minimum an Hilfsstoffen, wobei zum Teil bereits vorhandene Produktionsstraßen in der Pharmazeutischen Industrie verwendet werden können.

Eine detaillierte Vorstellung dieser nanopartikulären Arzneiform sprengt den Rahmen dieser Einleitung; es wird auf die Übersichtsartikel von Mehnert und Wissing verwiesen (Mehnert 2001; Wissing 2004).

2.4 Charakterisierung von Nanopartikeln

Im folgenden Abschnitt sollen die in dieser Arbeit verwendeten Charakterisierungsmethoden von Nanopartikeln kurz vorgestellt werden.

2.4.1 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS), welche auch als Photonen Korrelationsspektroskopie (PCS) bezeichnet wird, stellt das am häufigsten verwendete Verfahren zur Größenbestimmung von Nanopartikeln dar. Das Messverfahren basiert auf der Lichtstreuung kolloidalen Lösungen, die erstmals 1871 von John Tyndall beschrieben wurde: Beim Durchtritt eines Lichtstrahls durch eine kolleoidale Lösung ist ein senkrecht zum Lichtstrahl austretendes, bläuliches Streulicht zu beobachten. Dies Phänomen wird, nach seinem Entdecker, auch als Tyndall-Effekt bezeichnet. Die Intensität und Fluktuation des Streulichts kann zur Größenbestimmung der Kolloide genutzt werden.

Die nachfolgende Abbildung gibt schematisch den apparativen Aufbau einer Lichtstreuanlage wieder:

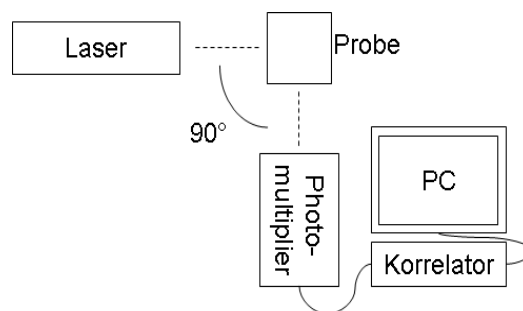


Abbildung 6 - Schematischer Aufbau einer Lichtstreuanlage

Das durch einen Laser erzeugte Streulicht wird durch einen Photomultiplier im 90° Winkel detektiert; der angeschlossene Korrelator vergleicht die Intensität $X(t)$ des Streulichts zum Zeitpunkt t mit der Intensität des Streulichtes zu einem späteren Zeitpunkt $X(t + \tau)$ und mittelt das Produkt $X(t) * X(t + \tau)$ über einen größeren Zeitraum. Dieser Mittelwert entspricht der Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$.

Die Autokorrelationsfunktion beschreibt die Diffusionsbewegung der dispergierten Partikel aufgrund der Brownschen Molekularbewegung.

Bei einer monodispersen Probe (Probe mit einheitlicher Teilchengröße) kann aus der Autokorrelationsfunktion der Diffusionskoeffizient D errechnet werden:

Formel 1 - exponentieller Abfall der Autokorrelationsfunktion bei monodispersen Teilchen

$$g(\tau) = e^{(-q^2 D \tau)}$$

Der Betrag des Streuvektors $|q|$ errechnet sich aus dem Brechungsindex des Lösungsmittels (n), der Wellenlänge des verwendeten Lasers (λ) und dem Streuwinkel (θ):

Formel 2- Betrag des Streuvektors

$$|q| = \frac{4 \pi n}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2}$$

Der Diffusionskoeffizient D ist über die Stokes-Einstein-Gleichung mit dem mittleren hydrodynamischen Radius d_h der Partikel verknüpft:

Formel 3- Stokes-Einstein-Gleichung,

k = Boltzmann Konstante, T = Temperatur, η = Viskosität des Lösungsmittels

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_h}$$

Zu erkennen ist, dass die Diffusionsgeschwindigkeit und somit die Fluktuation des Streulichts in erster Linie von der Größe der Partikel, der Temperatur und der Viskosität des verwendeten Dispersionsmittels abhängig ist. Je größer die dispergierten Teilchen sind, desto langsamer bewegen sie sich. Kleinere Teilchen werden durch die Lösungsmittelmoleküle stärker zur Bewegung angeregt und bewegen sich schneller.

Mit zunehmender Viskosität des Dispersionsmediums nimmt die Geschwindigkeit der Diffusionsbewegung der Partikel ab. Da die Viskosität stark von der Temperatur abhängig ist, muss bei allen Messungen auf Temperaturkonstanz geachtet werden. Der Messbereich wird durch die Dichte der Teilchen nach oben hin begrenzt.

Theoretisch ist die Größe von Partikeln mit geringem spezifischem Gewicht im Bereich von 3 nm – 3 µm messbar (Wagner 1986). Oberhalb dieser Grenze tritt Sedimentation der Teilchen ein. In der Regel findet die DLS allerdings nur im Größenbereich < 1 µm Anwendung.

2.4.2 Mikroskopische Verfahren

Lichtmikroskopische Verfahren eignen sich nicht zur Charakterisierung von nanopartikulären Arzneiformen, da ihre Auflösung durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts (400 – 800 nm) limitiert ist. Auch der Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie und CLSM erscheint aus diesem Grund für die Größenbestimmung von NP als wenig sinnvoll. Die maximale Auflösung beträgt ca. 200 nm. Allerdings eignen sich die letzten beiden Verfahren unter anderem zum intrazellulären Nachweis fluoreszierender NP (siehe Abschnitt 5).

Die Elektronenmikroskopie besitzt eine deutlich höhere Auflösung, da die hier verwendeten Elektronenstrahlen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht haben. Die Auflösung beträgt bei der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) weniger als 1 nm und bei der Raster-Elektronenmikroskopie weniger als 5 nm.

Ein relativ neues mikroskopisches Verfahren stellt die Raster-Kraft-Mikroskopie (RKM) dar, welche im Englischen als Atomic-Force-Microscopy (AFM) bezeichnet wird.

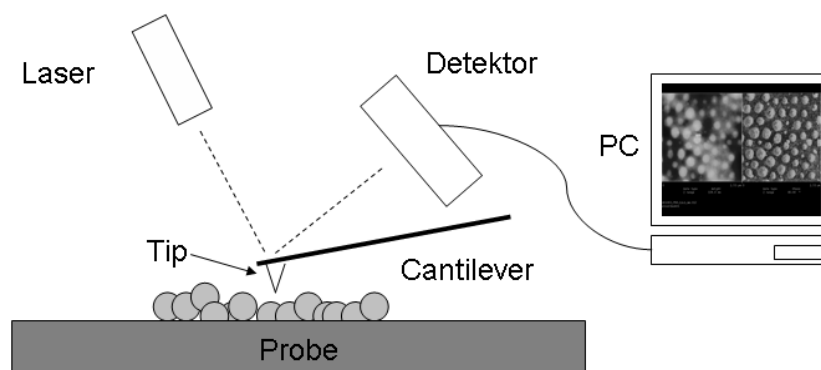


Abbildung 7- Schematischer Aufbau eines RKM

Bei diesem Verfahren wird das Objekt durch eine ultrafeine Nadel (Tip), welche an einer Blattfeder (dem Cantilever) befestigt ist, zeilenweise abgetastet und die Auslenkung des Cantilevers mit Hilfe eines Lasers gemessen. In Abhängigkeit von der Höhe der Probe wird der Laserstrahl in unterschiedlichen Winkeln reflektiert, was von einem Detektor erfasst, und mit Hilfe einer Software in ein Höhenprofil umgerechnet wird. Je nach Beschaffenheit der Probe sind hier Auflösungen im Bereich $< 1 \text{ nm}$ möglich (Haggerty 1993).

2.4.3 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation stellt eine weitere Möglichkeit der Größenbestimmung von Nanopartikeln dar. Hierbei wird die lokale Konzentration der Nanopartikel während der Zentrifugation bestimmt, welches Aussagen über die Sedimentationsgeschwindigkeit des Systems ermöglicht. Über die Sedimentationsgeschwindigkeit kann mit Hilfe der Dichte der NP die mittlere Teilchengröße errechnet werden.

Eine analytische Ultrazentrifuge besteht aus einer gewöhnlichen Ultrazentrifuge, welche mit einem speziellen, analytischen Rotor ausgestattet ist. Dieser Rotor gestattet die Messung der radialen Absorptionsverteilung der zu untersuchenden Suspension mit Hilfe eines Zweistrahlphotometers während des Zentrifugenlaufs.

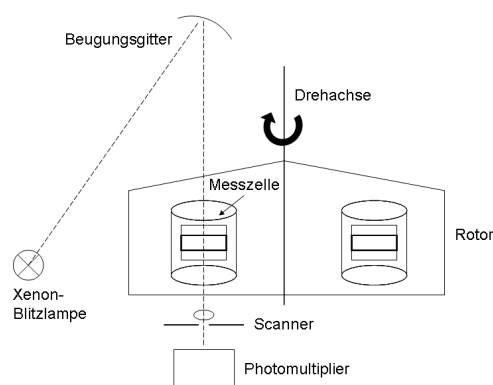


Abbildung 8 - Schematischer Aufbau einer analytischen Ultrazentrifuge

Die mathematischen Grundlagen werden im Abschnitt „Materialien und Methoden“ näher erläutert.

2.4.4 Gel-Permeations-Chromatographie

Die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC), welche auch unter dem Begriff Größen-Ausschluss-Chromatographie (englisch: Size Exclusion Chromatography, SEC) bekannt ist, wird seit über 20 Jahren zur Bestimmung des Molekulargewichts von Nanopartikeln eingesetzt (Bentele 1983). Die chromatographische Trennung beruht auf dem größenabhängigen Ausschluss von Polymeren vom Porenvolumen der stationären Phase. Als stationäre Phase dienen Säulen mit bekannter Porengröße.

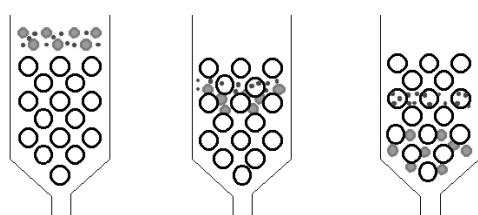


Abbildung 9 - Prinzip der
Größenausschlusschromatographie -
(MPI f. Polymerforschung, Mainz)

Je größer das Polymer, desto kleiner ist das ihm zur Verfügung stehende Verteilungsvolumen; umso kleiner das Verteilungsvolumen ist, umso schneller wird das Molekül eluiert.

2.4.5 Massenspektrometrie

Der Einsatz der Massenspektrometrie zur Detektion des Molekulargewichts größerer Polymere hat in den vergangenen Jahren stark zugenommen. In erster Linie ist dies auf die Entwicklung schonender Ionisierungstechniken (wie etwa MALDI-TOF) zurückzuführen, bei denen nur wenige Fragmentierungsreaktionen zu beobachten sind.

Bei der MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) handelt es sich um eine weiche Ionisierungsmethode, bei der die zu analysierende Probe nur wenig fragmentiert wird. In Kombination mit TOF (Time of Flight) ermöglicht dieses Verfahren die Untersuchung von Polymeren in einem breiten Massenbereich (Karas 1987; Spickermann 1996).

Die in eine Matrix eingebettete Probe wird hierbei durch Laserbeschuss desorbiert, ionisiert, und nach Durchlaufen einer definierten Beschleunigungsspannung anhand

ihrer Flugzeit in der feldfreien Driftstrecke aufgetrennt. Die Flugzeit ist abhängig von der Ladung und der Masse des Polymers.

2.4.6 Arzneistoffbeladung

Unter der Arzneistoffbeladung versteht man die Konzentration an nanopartikulär-gebundenem Arzneistoff im Bezug zur Gesamtkonzentration an verwendetem Arzneistoff.

Formel 4 – Berechnung der Arzneistoffbeladung

$$\text{Arzneistoffbeladung [\%]} = \frac{\text{partikulär gebundener Arzneistoff [mg / ml]}}{\text{Gesamtkonzentration Arzneistoff [mg / ml]}} * 100$$

Die Kenntnis der Arzneistoffbeladung der NP ist zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens und zur Berechnung der zu applizierenden Dosis von großer Bedeutung.

Meist erfolgt die Bestimmung der Beladung auf indirektem Wege durch Bestimmung der Konzentration an freiem, ungebundenem Arzneistoff. Hierzu wird der freie Arzneistoff von den Nanopartikeln durch Zentrifugation, Filtration oder ein anderes geeignetes Verfahren abgetrennt und der Gehalt an gelöstem, nicht gebundenem Arzneistoff bestimmt. Die Menge an gebundenem Arzneistoff errechnet sich aus der Gesamtmenge des Arzneistoffs abzüglich des freien Arzneistoffs.

2.4.7 Zetapotential (ξ -Potential)

Die Oberflächenladung von Nanopartikeln in Suspension wird durch das Nernstpotential beschrieben. Da dieses Potential messtechnisch jedoch schwer zugänglich ist, verwendet man häufig das Zetapotential, um die Oberflächenladung der Partikel zu beschreiben. Das Zetapotential ist in den meisten Fällen proportional zum Nernst-Potential; es stellt das elektrische Potential dar, welches sich zwischen der Scherungsebene der bewegten Teilchen und dem Neutralbereich ausbildet. Das Zetapotential wird mit Hilfe der elektrophoretischen Mobilität (Migration geladener

Teilchen im elektrischen Feld) der NP bestimmt. Hierzu wird die NP-Suspension in ein elektrisches Feld eingebracht. Abhängig von ihrem Zetapotential bewegen sich die NP mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Negativ geladene NP wandern zur Anode, positiv geladene Partikel wandern zur Kathode.

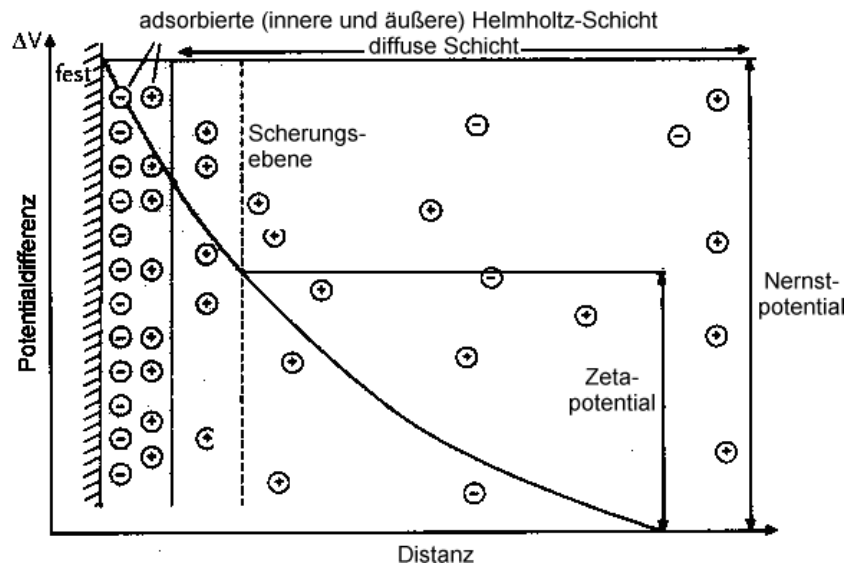


Abbildung 10 - Nernst- und Zetapotential – (modifiziert nach Voigt 2000)

Häufig wird diese Bewegung mit der Laser-Doppler-Anometrie detektiert. Die zu untersuchende Suspension wird in eine Mikro-Elektrophoresekammer eingebracht und die Geschwindigkeit, mit der sich die Partikel bewegen, wird mit Hilfe eines Lasers gemessen. Hierzu erzeugt der Laser ein sich hin- und herbewegendes Hell-Dunkel-Strichgitter. Wenn Partikel dieses Muster unterbrechen, werden am Detektor rhythmisch Lichtblitze aufgenommen.

Die Frequenz dieser Lichtblitze lässt auf die Geschwindigkeit der NP schließen. Mit den Faktoren Geschwindigkeit, Stärke des elektrischen Felds und der elektrophoretischen Beweglichkeit der NP kann das Zetapotential errechnet werden.

2.5 Tumorthherapie

Die Therapie von Tumoren besteht heutzutage meist aus einer initialen Chemotherapie um den Tumor zu verkleinern, gefolgt von einer operativen Entfernung des Tumors und einer anschließenden Bestrahlung oder weiteren Chemotherapie. Hintergrund der Chemotherapie und der Bestrahlung ist, die schnell proliferierenden Zellen des Tumors abzutöten.

Die Forschung konzentriert sich derzeit auf die Entwicklung neuer Arzneistoffe, neuer Applikationswege und auf die gezielte Pharmakotherapie (drug targeting). Ziel ist es einen möglichst potenten Wirkstoff in großen Konzentrationen in das Tumorgewebe zu bringen und gesundes Gewebe von den Nebenwirkungen der Zytostatika zu verschonen.

2.5.1 Glioblastome

Die große Gruppe der Hirntumore lässt sich grob in zwei Klassen einteilen: i) primäre Tumore, welche im ZNS entstanden sind und ii) sekundäre Tumore, welche Metastasen von Tumoren außerhalb des ZNS darstellen.

Ungefähr die Hälfte aller primären Hirntumoren entsteht aus Gliazellen, und mehr als 75 % dieser Gliome zählen zu den Astrozytomen. Die Astrozytome können nach dem WHO-Schema in 4 Stufen eingeteilt werden (Kleihues 2000):

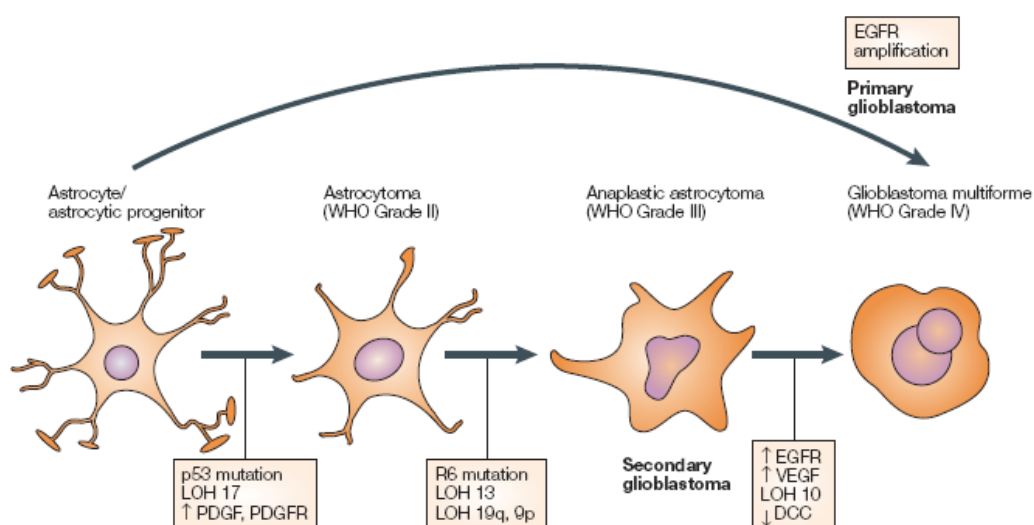


Abbildung 11 - Entstehung und Progression von Gliomen – (aus Lesniak 2004)

Die häufigste und bösartigste Form der Astrozytome wird auch als Glioblastom (glioblastoma multiforme) bezeichnet.

Diese hochmaligne Tumorart tritt bevorzugt im Großhirn Erwachsener im Alter zwischen 45 und 70 Jahren auf. Die Therapie besteht aus der operativen Entfernung des Tumors und einer nachfolgenden Strahlentherapie. Häufig wird heute entweder direkt nach der Strahlentherapie oder zur Behandlung eines Rezidivs eine Chemotherapie angeschlossen. Als Zytostatika finden hier insbesondere die relativ gut hirngängigen Nitrosoharnstoffe Carmustin, Lomustin und Temozolomid Anwendung.

Die Prognose ist trotz alledem schlecht, sie liegt nach der operativen Entfernung des Tumors und nachfolgender Strahlentherapie bei nur 6 – 9 Monaten. Auch die medikamentöse Therapie verbessert die Aussichten nur geringfügig (Kemper 2004; Lesniak 2004).

Glioblastome zeigen eine verstärkte Expression des Efflux-Transporters Pgp was die Möglichkeiten einer chemotherapeutischen Behandlung dieser Tumorform stark einschränkt (Rittierodt 2003).

Ein weiterer Grund für die nur geringe Wirksamkeit einer systemisch applizierten Zytostatika-Therapie ist die Existenz der Blut-Hirn-Schranke. Obwohl die BHS in der Nähe des Haupttumors nicht mehr vollständig intakt ist, behindert sie den Transport der antitumoralen Wirkstoffe insbesondere zu den peripheren Tumorregionen.

Ein verbesserter Transport des Arzneistoffes zum Wirkort (z.B. durch Nanopartikel) wäre eine aussichtsreiche Möglichkeit die Therapie von Gehirntumoren zu verbessern.

Bei der in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Chemotherapie an Ratten wurde der Tumor 101/8 verwendet, der aus dem Labor von A.S. Khalansky (Institute for Morphology of Man, Moskau, Russland) stammt. Dieser Tumor ähnelt den menschlichen Glioblastomen in Bezug auf Histologie und aggressivem Wachstum.

2.5.2 Doxorubicin

Doxorubicin gehört zur Klasse der Anthracyclin-Antibiotika. Dieser seit den 60er Jahren bekannte Arzneistoff stellt eines der am häufigsten angewendeten Zytostatika dar. Die antitumorale Wirkung kommt durch mehrere Mechanismen zustande:

- 1.) Interkalation mit der DNS
- 2.) Hemmung der Topoisomerase I und II
- 3.) Hemmung von Helikasen
- 4.) Bildung freier Sauerstoffradikale

Für die Hauptwirkung dürften jedoch die Interkalation des Arzneistoffs mit der DNS und die Hemmung der Topoisomerase II verantwortlich sein.

Doxorubicin wird beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, Mamakarzinom, Ovarialkarzinom, Harnblasenkarzinom, Osteosarkom, Weichteilsarkom, Hodgkin-Lymphom, Leukämie, Schilddrüsenkarzinom und Magenkarzinom angewendet (Mutschler 2001; Pharmacia 2004). Aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit im ZNS wird es nur sehr selten bei Tumoren des Zentralen Nervensystems eingesetzt, obwohl gezeigt werden konnte, dass eine intratumorale Injektion des Doxorubicin zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit von Gliompatienten führt (Walter 1995).

Doxorubicin besitzt eine große Anzahl von unerwünschten Arzneimittelwirkungen; in erster Linie sind Myelosuppression (Leukopenie), Kardiotoxizität (Kardiomyopathie), Alopezie und gastro-intestinale Nebenwirkungen zu nennen.

Der Arzneistoff findet sich unter anderem in den Fertigarzneimitteln Adriblastin[®] (Pharmacia) oder Caelyx[®] (Essex Pharma). In Caelyx liegt der Arzneistoff in liposomaler Form vor.

Da der Arzneistoff ein gutes Substrat für den Efflux-Transporter Pgp darstellt, ist die Bioverfügbarkeit in Zellen, welche eine starke Expression dieses Transporters zeigen, stark herabgesetzt. Bei der Behandlung von Glioblastomen stellt dies gleich auf zweifache Weise einen Nachteil dar, da sowohl die Endothelzellen der BHS als

auch die Tumorzellen eine starke Expression dieses Multidrug-Resistance-Transporters zeigen (Rittierodt 2003).

Durch die Applikation der liposomalen Formulierung konnte eine Reduktion der Nebenwirkungen und eine bessere Bioverfügbarkeit erreicht werden. Durch die Applikation von Doxorubicin in nanopartikulärer Form könnte eine weitere Reduktion der Nebenwirkungen, eine Hemmung der Efflux-Systeme und ein verbessertes Erreichen des ZNS bewerkstelligt werden.

Aufgrund seiner aromatischen, planaren Ringstruktur zeigt dieser Arzneistoff eine relativ ausgeprägte Fluoreszenz, welche sich zum Nachweis des Arzneistoffs mittels CLSM, FACS oder HPLC nutzen lässt.

In der nachfolgenden Tabelle sind weitere, wichtige physikochemische Eigenschaften der Substanz aufgelistet.

Abbildung 12 - Strukturformel von Doxorubicin

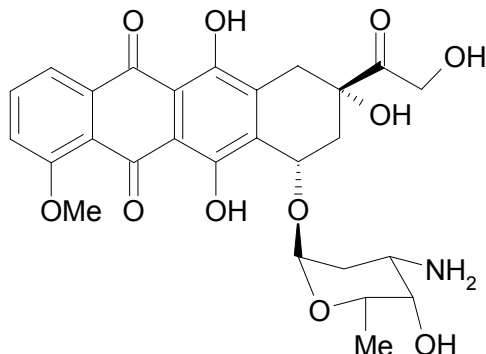


Tabelle 2 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften des Doxorubicin

Molekulargewicht	579,98 g/mol
Summenformel	$C_{27}H_{29}NO_{11} \times HCl$
Schmelzpunkt	216°C
Löslichkeit (in Wasser)	10 mg/ml, rot-orange
Fluoreszenz (in Ethanol)	λ_{ex} 470 nm λ_{em} 585 nm

2.5.3 Doxorubicin-beladene PBCA-Nanopartikel

Die Verwendung von Doxorubicin-beladenen NP in der Tumorthherapie gehört zu den vielversprechendsten Anwendungen im Bereich der kleinpartikulären Trägersysteme. Zum einen verspricht man sich durch den EPR-Effekt der NP eine Akkumulation des Arzneistoffträgers (Matsumura 1986), und somit des Arzneistoffs am Wirkort, und zum anderen erhofft man niedrigere Konzentrationen des Zytostatikums in Nicht-Ziel-Organen, was zu einer Verminderung der Nebenwirkungen der Chemotherapie führt.

Die ersten toxikologischen Untersuchungen zu Doxorubicin-beladenen Poly(isobutylcyanoacrylat)-NP gehen auf Couvreur zurück. Couvreur et al. konnten zeigen, dass die Toxizität des nanopartikulär gebundenen Arzneistoffs im Vergleich zum freien Arzneistoff erniedrigt ist (Couvreur 1982).

Später konnte im Tierversuch an Ratten gezeigt werden, dass Doxorubicin, welches an Polysorbat 80 überzogene PBCA-NP gebunden ist, die Blut-Hirn-Schranke mehr als 60 x besser überwindet als die reine Arzneistoff-Lösung. Gleichzeitig war die Konzentration in Nicht-Ziel-Organen, wie etwa dem Herz, signifikant verringert (Gulyaev 1999). Ein darauf folgender Behandlungsversuch an Glioblastom-tragenden Ratten zeigte bei 38 % der Tiere eine komplette Remission des Tumors (Gelperina 2000); dieses Ergebnis konnte in einer zweiten, größeren Studie an 151 Ratten bestätigt werden: über 20 % der Tiere zeigten eine komplette Remission (Steiniger 2004).

Auch scheint die Aufnahme des nanopartikulär vorliegenden Arzneistoffs in MDR-resistente Zellen, wie etwa den MDR-resistenten Glioblastom-Zelllinien, im Vergleich zur freien Lösung deutlich verbessert (Bennis 1994).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Nanopartikelherstellung

Nanopartikel auf Basis von Butylcyanoacrylat (BCA) wurden im Rahmen dieser Arbeit durch drei unterschiedliche Methoden erhalten:

- (1) Emulsionspolymerisation
- (2) radikalische Polymerisation
- (3) Nanopräzipitation

Bei den ersten beiden Verfahren wird das Monomer BCA zu PBCA polymerisiert, woraufhin die gebildeten Polymerketten im wässrigen Milieu in Form von Nanopartikeln ausfallen. Bei der Nanopräzipitation wird ein vorgebildetes Polymer in einem flüchtigen, organischen Lösungsmittel gelöst und durch Zugabe eines Nicht-Lösungsmittels in Form von Nanopartikeln ausgefällt.

3.1.1 Emulsionspolymerisation

3.1.1.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Dextran 70.000	Sigma, Steinheim
Pluronic [®] F68 (Poloxamer 188)	Sigma, Steinheim
Pluronic [®] L61	BASF, Ludwigshafen
Pluronic [®] P85	BASF, Ludwigshafen
Tween [®] 80 (Polysorbat 80)	Fluka, Seelze
Salzsäure 0,01 N	Merck, Darmstadt
Natronlauge 1 N	Merck, Darmstadt
n-Butyl-(2)-cyanoacrylat (Sicomet [®] 6000)	Sichel-Werke, Hannover
Mannitol	Merck, Darmstadt
Doxorubicin HCl	Sicor, Rho, Italien
Al-Phthalocyanin	E.A. Lukyanets, NIOPIK, Russland

Material und Methoden

Co-Phthalocyanin	E.A. Lukyanets, NIOPIK, Russland
FITC-Dextran 70.000	Sigma, Steinheim
5-(4,6-Dichloro-s-triazin-2-ylamino)fluorescein (DTAF)	Fluka, Seelze
Rhodamin-6G	Sigma, Steinheim
Rhodamin-123	Fluka, Seelze
Propidiumiodid	Fluka, Seelze

500 ml 10x Phosphatpuffer pH 7,0:

35,5 g Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Konz. Phosphorsäure (zur pH-Einstellung)	Fluka, Seelze
auf 500 ml Milli-Q Wasser	Millipore, Eschborn

1000 ml Borat-Puffer pH 9,0:

6,20 g Borsäure	Sigma, Steinheim
1 N Natronlauge (zur pH-Einstellung)	Merck, Darmstadt
auf 1000 ml Milli-Q Wasser	Millipore, Eschborn

Materialien und Geräte:

Sicherheitswerkbank Herasafe HS 12	Heraeus, Hanau
Analysenwaage Sartorius CP 224S	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Magnetrührer Variomag® Multiport HP15	Dr. Hoiss und Partner, München
Glasfritte G2	Schott, Mainz
Knick pH-Meter 766	Knick, Berlin
Lyovac GT 2 Gefriertrockner	Leybold AG, Köln
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex RK 31	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin

3.1.1.2 Polymerisation

1 % (m/V) des Monomers n-Butyl-(2)-cyanoacrylat (BCA) wurde unter Rühren auf dem Magnetrührer (500 Upm) langsam unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche zu einer 0,01 N Salzsäure-Lösung zugegeben (pH 2). Die Salzsäure-Lösung enthielt 1 % (m/V) Pluronic® F68 als Stabilisator. Nach Zugabe des Monomers wurde die Suspension 4 h gerührt und anschließend durch Zugabe von 1 N Natronlauge auf einen pH-Wert zwischen 6 und 7 eingestellt. Größere Polymeragglomerate wurden mittels Filtration durch eine Glasfritte der Porengröße G2 (40 – 90 µm) abgetrennt.

Alternativ kann anstelle von NaOH auch ein konzentrierter Phosphat-Puffer zur Neutralisation verwendet werden. Hierbei wird zu 10 ml Nanopartikelsuspension 1 ml 10x Phosphat-Puffer gegeben, so dass ein ungefähr 1x Phosphatpuffer resultiert.

Um den Einfluss des Stabilisators auf die Polymerisation zu untersuchen wurden neben Pluronic® F68 noch Dextran 70.000 (1 % m/V) und Pluronic® P85 (0,25 % m/V) eingesetzt (übliche Konzentration in Klammern). Der Einfluss des pH-Werts auf die Polymerisation wurde im Bereich von pH 1 - 3 untersucht. Hierzu wurde anstelle der 0,01 N HCl eine 0,1 N HCl bzw. 0,001 N HCl verwendet.

Auf eine weitere Aufreinigung der Partikel durch Ultrazentrifugation, Ultrafiltration, Gel-Chromatographie oder Dialyse konnte verzichtet werden, da nur unbedenkliche Hilfsstoffe für die Herstellung verwendet wurden.

Die Proben für die Tierversuche wurden mit 3 % (m/V) Mannitol versetzt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet. Rekonstitution dieser Partikel erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Volumens an Milli-Q Wasser und Vortex-Behandlung für 2 min. Alle übrigen Proben wurden bei 4 °C unter Lichtausschluß gelagert.

3.1.1.3 Doxorubicin-beladene NP durch Emulsionspolymerisation

Doxorubicin (DOX) beladene PBCA-Nanopartikel wurden analog zu den leeren Arzneistoffträgern hergestellt. 30 Minuten nach dem Start der Polymerisation wurde Doxorubicin als 2,5 % (m/V) Stammlösung (in 0,01 N Salzsäure) hinzu gegeben. Die Endkonzentration von Doxorubicin in der Lösung betrug 0,25 % (m/V). Die Polymerisation wurde bereits nach 2,5 h durch Neutralisation mit NaOH beendet.

Eine Neutralisation mit Phosphat-Puffer sollte unterbleiben, da es zu einer Inkompatibilität zwischen dem Arzneistoff und den mehrwertigen Anionen des Puffers kommt.

Um den Einfluss der Arzneistoffkonzentration auf die Partikeleigenschaften zu untersuchen, wurden auch Zubereitungen mit geringeren Doxorubicin-Konzentrationen hergestellt.

Alle Arbeiten mit Zytostatika wurden unter einer Heraeus-Sicherheitswerkbank (Klasse 2) durchgeführt.

3.1.1.4 Phthalocyanin-beladene NP durch Emulsionspolymerisation

Phthalocyanin-beladene NP wurden analog zu Doxorubicin-beladenen NP hergestellt. Co- und Al-Phthalocyanin wurden als Lösung in 0,01 N HCl zugegeben um eine Endkonzentration von 0,1 % (m/V) zu erreichen. Die Reaktion wurde nach 2,5 h durch Neutralisation mit 1 N NaOH beendet.

3.1.1.5 FITC-Dextran-beladene NP durch Emulsionspolymerisation

FITC-Dextran-gelabelte NP wurden analog zu leeren Dextran-stabilisierten NP hergestellt. 50 % (m/m) des Stabilisators Dextran 70.000 wurden vor Reaktionsbeginn gegen das FITC-markierte Derivat ausgetauscht.

3.1.1.6 Propidiumiodid beladene NP durch Emulsionspolymerisation

0,2 g Dextran 70.000 und 8 mg Propidiumiodid wurden in 20 ml 0,01 N HCl gelöst. Unter Rühren bei 500 Upm wurden 200 µl BCA zugegeben. Die Suspension wurde nach 4 h durch Zugabe von 0,1 N NaOH neutralisiert. Größere Polymeragglomerate wurden mittels Filtration durch eine Glasfritte der Porengröße G2 (40 – 90 µm) abgetrennt. Freies PI wurde durch Waschen der Partikel abgetrennt: Die NP-Suspension wurde 40 min bei 16.100 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit Hilfe von Vortex (1 min) und Ultraschall (10 min) in Milli-Q redispergiert. Das Waschen der Partikel wurde insgesamt 3x durchgeführt.

3.1.1.7 Rhoadmin-123 beladene NP durch Emulsionspolymerisation

30 mg Dextran 70.000 wurden in 3 ml 0,01 N HCl gelöst. Unter Rühren auf dem Magnetrührer bei 500 Upm wurden 30 µl BCA zugegeben. 30 min nach Beginn der Polymerisation wurden 0,3 ml Rhodamin-123-Lösung (c= 1 mg/ml in 0,01 N HCl) zugegeben. Nach einer Gesamtzeit von 2,5 h wurde die Suspension durch Zugabe von ca. 29 µl 1 N NaOH neutralisiert. Größere Aggregate wurden durch Filtration, wie bereits beschrieben abgetrennt. Freies Rhodamin-123 wurde wie unter „Propidiumiodid beladene NP durch Emulsionspolymerisation“ (3.1.1.6) beschrieben, entfernt.

3.1.1.8 Modifikation leerer NP mit DTAF

5-(4,6-Dichloro-s-triazin-2-ylamino)fluorescein (DTAF) markierte NP wurde durch Modifikation leerer, Pluronic® F68-stabilsierter NP erhalten: 5 ml der NP-Suspension wurde mit 5 ml einer 1 %igen (m/V) Lösung von DTAF in Borat-Puffer pH 9,0 gemischt und auf dem Magnetrührer bei 500 Upm gerührt. Nach 24 h wurde die Suspension durch Zugabe eines 10x Phosphat-Puffers neutralisiert.

Die Stabilität der NP bei pH 9 wurde durch photometrische Messung der Trübung bei 420 nm untersucht. Es konnte keine Abnahme der Trübung, und damit der Partikelkonzentration, im Zeitraum bis 24 h festgestellt werden. Freies DTAF wurde wie unter 3.1.1.6 beschrieben, entfernt.

3.1.1.9 Adsorption von Rhodamin-6G an leere NP

Rhodamin-6G markierte NP wurden durch adsorptive Beladung von leeren Dextran-stabilisierten NP erhalten (Zimmer 1991): 5 ml der NP-Suspension wurden mit 5 ml einer Rhodamin-Stammlösung für 24 h bei 4 °C inkubiert. Die Rhodamin-Stammlösung bestand aus 17,7 g Rhodamin-6G in 40 ml Milli-Q-Wasser. Freies Rhodamin wurde wie unter 3.1.1.6 beschrieben, entfernt.

3.1.2 Radikalische Polymerisation

3.1.2.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Dextran 70.000	Sigma, Steinheim
0,2 M Salpetersäure	Riedel-de-Haen, Seelze
n-Butyl-(2)-cyanoacrylat (Sicomet® 6000)	Sichel-Werke, Hannover
1 N Natronlauge	Merck, Darmstadt

0,08 M Ammonium-Cer(IV)-nitrat-Lösung:

0,438 g Ammonium-Cer(IV)-nitrat	Fluka, Seelze
auf 10,0 ml 0,2 M Salpetersäure	Riedel-de-Haen, Seelze

1,02 M Natriumcitrat-Lösung:

3,0 g Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma, Steinheim
auf 10,0 ml Milli-Q-Wasser	Millipore, Eschborn

Materialien und Geräte:

Analysenwaage Sartorius CP 224S	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen

3.1.2.2 Polymerisation

Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Chauvierre et al. (Chauvierre 2002): 0,1375 g Dextran 70.000 wurden in 8 ml 0,2 M Salpetersäure

gelöst. Diese Lösung wurde bei 40 °C auf dem Magnetrührer intensiv gerührt und 2 ml Ammonium-Cer(IV)-nitrat-Lösung sowie 500 µl BCA hinzu gegeben. Nach 40 min wurde die Suspension abgekühlt und 1,25 ml einer Natrium-Citrat-Lösung zugegeben. Abschließend wurde die Suspension mit 1 N NaOH neutralisiert.

3.1.3 Nanopräzipitation

3.1.3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Dextran 70.000	Sigma, Steinheim
Pluronic® F68 (Poloxamer 188)	Sigma, Steinheim
Pluronic® P85	BASF, Ludwigshafen
n-Butyl-(2)-cyanoacrylat (Indermil™)	Loctite, Dublin, Irland
Milli-Q-Wasser	Millipore, Eschborn
Nile Red	Fluka, Seelze

Materialien und Geräte:

Analysenwaage Sartorius CP 224S	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Lyovac GT 2 Gefriertrockner	Leybold AG, Köln

3.1.3.2 Polymerisation und Nanopräzipitation

Zunächst wurde aus dem Monomer n-Butyl-(2)-cyanoacrylat das Polymer hergestellt. Hierzu wurde Milli-Q-Wasser auf einem Magnetrührer intensiv gerührt (Stufe 8) und das Monomer langsam zugegeben. Durch die Verwendung des langsamer polymerisierenden Monomers Indermil™ (enthält neben SO₂ noch einen weiteren Stabilisator, der die Polymerisation verzögert) kommt es erst nach einigen Minuten zur Polymerbildung und zur Trübung des Ansatzes. Nach 6 h wurde das Rühren gestoppt und der gesamte Ansatz gefriergetrocknet. Es entsteht ein weißes, stark elektrostatisches Pulver, welches aus reinem Polymer besteht.

Eine direkte Emulsionspolymerisation ist mit Indermil™ als Monomer nicht möglich, da es bei niedrigem pH zu langsam polymerisiert.

Einhundert Milligramm des reinen Polymers wurden in 10 ml Aceton gelöst (1 % m/V). Zu dieser Lösung wurden unter Rühren auf dem Magnetrührer 10 ml einer wässrigen Stabilisator-Lösung gegeben. Durch die Zugabe dieses Nicht-Lösungsmittels wurde die Löslichkeit des Polymers im Medium vermindert und das Polymer fiel in Form von Nanopartikeln aus. Als Stabilisatoren wurden, analog zu den Stabilisatoren der Emulsionspolymerisation, Dextran 70,000, Pluronic® F68 und Pluronic® P85 in den üblichen Konzentrationen verwendet. Das vorhandene Aceton wurde durch starkes Rühren der Suspension bei Raumtemperatur für 24 – 48 h unter Normaldruck entfernt.

3.1.3.3 Nile Red-beladene NP durch Nanopräzipitation

Nile Red-beladene NP wurden analog den leeren NP über die Nanopräzipitation hergestellt. Hierzu wurde neben 100 mg des reinen Polymers auch 3 µg Nile Red in 10 ml Aceton gelöst. Zu dieser Lösung wurde sodann eine 1 %ige (m/V) wässrige Lösung von Pluronic® F68 gegeben.

3.1.4 Coating der Nanopartikel

Das Überziehen der hergestellten NP mit einem Tensidfilm (Coating) erfolgte durch Adsorption des Tensids an die Partikeloberfläche. Hierzu wurden die Nanopartikel mit 1 % (m/V) Tensidlösung versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt (500 Upm).

Als Coating wurden verwendet: Polysorbat 80 (PS80), Pluronic® F68 (F68), Pluronic® L61 (L61) und Pluronic® P 85 (P85).

Tabelle 3 - Eigenschaften der verwendeten Tenside

Tensid	Molekulargewicht	CMC µM	CMC % (m/V)	HLB	Literatur
Polysorbat 80	1310	12	0,0016 %	15	Datenblatt
Pluronic® F68	8400-8800	1140	1 %	29	Sigma Aldrich,
Pluronic® L61	1950	k. A.	k. A.	< 12	Batrakova (1998),
Pluronic® P85	4600	67	0,03 %	12 - 18	Kabanov (2002)

CMC = Kritische Mizellbildungskonzentration, HLB = hydrophilic lipophilic balance

3.2 Charakterisierung der Nanopartikel

Die verwendeten Partikel wurden vor der Testung in der Zellkultur bzw. der Testung am Tier in Bezug auf Größe, Größenverteilung, Morphologie, Zetapotential Partikelausbeute, mittleres Molekulargewicht des Polymers und Arzneistoffbeladung charakterisiert. Zur Bestimmung der mittleren Partikelgröße wurden fünf verschiedene Verfahren angewandt: Dynamische Lichtstreuung (DLS), Analytische Ultrazentrifugation (AUZ), Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), Raster-Elektronenmikroskopie (REM) und Raster-Kraft-Mikroskopie (RKM). Das mittlere Molekulargewicht wurde über Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) und MALDI-TOF Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) bestimmt.

3.2.1 Dichte der Nanopartikelsuspension

Die Bestimmung der Dichte erfolgte mit einem density meter PAAR DMA 48 (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich). Die Bestimmung beruht auf der Messung der Schwingungsdauer eines ungedämpft schwingenden U-Rohrs, welches mit der Suspension befüllt wird. Die Schwingdauer verändert sich in Abhängigkeit zur Masse der eingefüllten Substanz. Bei bekanntem Volumen kann hierdurch die Dichte errechnet werden. Das Gerät wurde vor der Messung mit Luft ($\rho = 0,001204 \text{ g/cm}^3$) und gereinigtem Wasser ($\rho = 0,998204 \text{ g/cm}^3$) kalibriert. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

3.2.2 Viskosität der Nanopartikelsuspension

Die Bestimmung der Viskosität der verwendeten Suspensionen erfolgte mit einem Kapillarviskosimeter nach Cannon-Fenske (Schott & Gen, Mainz). Gemessen wurde die Zeit, die ein bestimmtes Volumen der Nanopartikelsuspension benötigt, um durch eine Kapillare zu strömen. Anhand des Gesetzes nach Hagen-Poiseuille konnte aus der Strömungsgeschwindigkeit der laminar ausfließenden Suspension mit bekannter Dichte und bei bekanntem Radius und Länge der Kapillare die Viskosität berechnet werden. Für die Suspension wurde ein idealviskoses Fließverhalten angenommen.

Vor Messung der Zubereitungen wurde das Kapillarviskosimeter mit gereinigtem Wasser ($\eta = 1,008 \text{ mPa} \cdot \text{s}$) kalibriert. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

3.2.3 Freier Formaldehyd in der Nanopartikelsuspension

3.2.3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Milli-Q-Wasser	Millipore, Eschborn
Formaldehyd-Lsg., 35 %, Ph.Eur.	Merck, Darmstadt

Acetylaceton-Lösung R1:

15,0 g Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
0,3 ml Essigsäure 99%	Merck, Darmstadt
auf 100 ml Milli-Q-Wasser	Millipore, Eschborn
+ 0,2 ml Acetylaceton	Merck, Darmstadt

Materialien und Geräte:

Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
DU-800 Spectrophotometer	Beckman Coulter, USA

3.2.3.2 Durchführung

Freier Formaldehyd in der Nanopartikelsuspension wurde in Anlehnung an die Methode A des Europäischen Arzneibuchs „Freier Formaldehyd“ (2.4.18) mit Hilfe des Nash-Reagenzes bestimmt (Nash 1953). Da es durch die Nachweisreaktion eventuell zu einer zusätzlichen Freisetzung von Formaldehyd aus dem Polymer kommt, wurde die Bestimmung zum einen für die komplette NP-Suspension und zum anderen nur für den Überstand der NP-Suspension durchgeführt. Zur Abtrennung der NP wurde die NP-Suspension 40 min bei 16,100 g zentrifugiert.

Anschließend wurden 10 µl der NP-Suspension bzw. des Überstands mit 490 µl Milli-Q-Wasser verdünnt und mit 500 µl Acetylaceton-Lösung R1 versetzt. Das

Reaktionsgefäß wurde 40 min bei 40 °C inkubiert. Die Absorption der Lösung wurde anschließend im Photometer bei 413 nm gegen eine 1:1 Mischung Acetylaceton/Wasser gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit einer Kalibriergeraden im Konzentrationsbereich zwischen 5 – 20 µg/ml. Hierzu wurden Lösungen von Formaldehyd mit bekanntem Gehalt hergestellt und gleichzeitig mit der Probe inkubiert und vermessen.

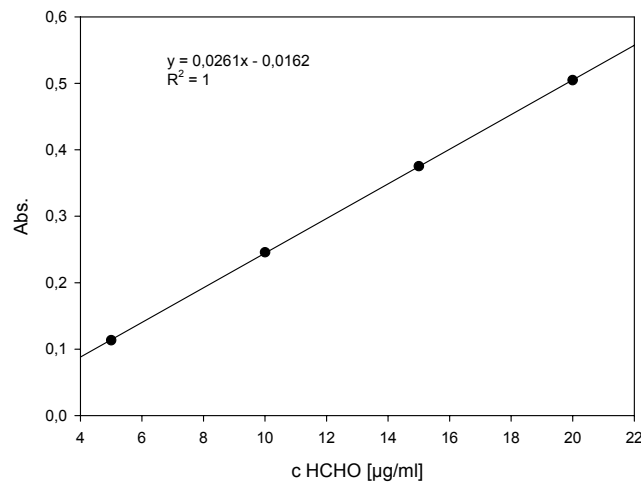


Abbildung 13 - Kalibriergerade für Formaldehyd

Zusätzlich wurden NP untersucht, welche vor der Messung 1 h bei 60 °C gestresst wurden, was die Freisetzung von zusätzlichem Formaldehyd bedingt.

3.2.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

3.2.4.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Milli-Q-Wasser	Millipore, Eschborn

Materialien und Geräte:

Malvern Zetasizer 3000 HS _A	Malvern, Worcs, GB
PCS-Küvetten (10 x 10 x 48 mm)	Sarstedt, Nürnberg

3.2.4.2 Probenvorbereitung, Messung

Der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel wurde mit einem Malvern Zetasizer 3000 HS_A bei 25°C bestimmt. Dieses mit einem 10 mW Helium-Neon Laser ausgestattete Gerät misst die Streulichtintensität der Suspension im 90° Winkel. Der mittlere Durchmesser der Partikel kann über den Diffusionskoeffizienten, welcher durch die Autokorrelationsfunktion zugänglich ist, errechnet werden (siehe 2.4.1.)

Die NP-Suspension wurde vor der Messung 1:20 mit einer 0,9 % (m/m) wässrigen Natriumchlorid-Lösung verdünnt, um den „primary charge effect“ zu eliminieren. Die Auswertung der Autokorrelationsfunktion erfolgte mit der Software des Geräteherstellers unter Annahme einer monomodalen Verteilung. Als Analysemethode wurde „multiple mode analysis“ gewählt.

3.2.5 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

3.2.5.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Milli-Q-Wasser	Millipore, Eschborn

Materialien und Geräte:

Beckman Optima XL-A Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, USA
An-50Ti Rotor	Beckman Coulter, USA

3.2.5.2 Bestimmung des Durchmessers und der Partikelmasse

Die AUZ-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Vitali Vogel und Prof. Dr. Dieter Schubert am Institut für Biophysik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt. Analog zur Probenvorbereitung für die dynamische Lichtstreuung wurden die Proben vor der Messung 1:20 mit 0,9 % (m/m) NaCl-Lösung in Wasser verdünnt. Die Experimente zur Sedimentationsgeschwindigkeit wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A von Beckman Coulter mit einem An-50Ti-Rotor bei 4000 Upm und 20 °C durchgeführt. Die Trübung der Suspension wurde bei 420 nm photometrisch erfasst und gegen den Radius aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms „Sedfit“ (Peter Schuck, NIH, Bethesda, USA) unter der Annahme nicht-diffundierender Partikel modelliert. Die hieraus resultierenden Sedimentationskonstanten konnten mit Hilfe nachfolgender Formeln in eine Größenverteilung umgerechnet werden:

Formel 5 – Svedberg-Gleichung: Berechnung der Sedimentationskonstante (s),
M = Masse des Partikels, N_a = Avogadro-Konstante, ρ_0 = Dichte des Lösungsmittels,
 \bar{v} = partielles spezifisches Volumen der Partikel, f = Reibungskoeffizient

$$s = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho_0)}{N_a \cdot f}$$

Formel 6 – Berechnung der Masse (M) eines NP,
d = Durchmesser der Kugel, ρ_k = Dichte der Kugel

$$M = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot d^3 \cdot \rho_k$$

Formel 7 - Berechnung des Reibungskoeffizienten (f), η = Viskosität des Lösungsmittels

$$f = 3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d$$

Die so berechneten Sedimentationskoeffizienten wurden in $s_{20,w}$ -Werte (Standardbedingungen) umgerechnet, was dem Sedimentationskoeffizienten der Partikel in Wasser bei 20° C entspricht.

3.2.5.3 Bestimmung der Dichte der NP

Die Dichte ist ein wichtiger Faktor bei der Charakterisierung der gebildeten Nanopartikel. Sie wird unter anderem benötigt, um die mittlere Masse eines Partikels zu berechnen. Die Dichte wurde über die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit der NP in H₂O/D₂O-Mischungen bestimmt. Die Dichte des Mediums wurde gegen den Sedimentationskoeffizienten aufgetragen. Bei $S_m = 0$ (= keine Sedimentation = Schwimmdichte) kann die Partikeldichte abgelesen werden.

3.2.6 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

3.2.6.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Materialien und Geräte:

Probenteller	Werkstätten d. Universität Frankfurt
Lyovac GT 2 Gefriertrockner	Leybold AG, Köln
SEM Hitachi S-45000	Hitachi, Japan
Paint Shop Pro 5	Jasc Software, USA

3.2.6.2 Probenvorbereitung, Messung

Die REM-Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Manfred Ruppel am Botanischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt angefertigt. Die Nanopartikelsuspension wurde 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt und ca. 20 µl dieser Verdünnung wurden auf den Probenteller aufgetragen. Die Probe wurde über Nacht gefriergetrocknet und anschließend mit Gold überzogen. Die fertige Probe wurde mit dem Hitachi Raster-Elektronenmikroskop bei 15 kV und einem Abstand von 15 mm betrachtet. Der Durchmesser der Nanopartikel wurde mit Hilfe der Software Paint Shop Pro ermittelt.

3.2.7 Raster-Kraft Mikroskopie (RKM)

3.2.7.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Materialien und Geräte:

Objektträger (Glas)	VWR, Darmstadt
Lyovac GT 2 Gefriertrockner	Leybold AG, Köln
Multimode AFM, Nanoscope IIIa Kontroller	Veeco, Santa Barbara, USA

3.2.7.2 Probenvorbereitung, Messung

Die Aufnahmen der PBCA-NP wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Michael Kappl im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Butt am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz erstellt.

10 µl der unverdünnten NP-Suspension wurden auf einen gereinigten Objektträger aufgetragen und über Nacht gefriergetrocknet. Die Probe wurde ohne weitere Behandlung mit einem Multimode AFM im non-contact (tapping)-Mode betrachtet.

3.2.8 Zetapotential der Nanopartikel

Das Zetapotential der NP wurde mit Hilfe eines Malvern Zetasizer HS_A 3000 unter Verwendung einer Dip Cell bestimmt. Da die Ladung der NP stark von der Partikelkonzentration, der Ionenstärke und dem pH-Wert des Mediums abhängt, wurden alle Messungen bei gleicher Verdünnung in einem verdünnten Phosphatpuffer pH 7,4 vermessen.

3.2.8.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Verdünnter Phosphatpuffer, pH 7,4:

(in Anlehnung an Phosphatpuffer pH 7,4 Ph.Eur., 1:100 verdünnt, Ionenstärke (µ) ca. 0,005 M)

68,0 mg Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
3,9 ml 0,1 N Natronlauge	Merck, Darmstadt
640 ml Milli-Q Wasser	Millipore, Eschborn

Materialien und Geräte:

Malvern Zetasizer 3000 HS _A	Malvern, Worcs, GB
PCS-Küvetten (10x10x48 mm)	Sarstedt, Nürnberg

3.2.8.2 Probenvorbereitung und Messung

Die NP-Suspension wurde vor der Messung 1:20 mit Phosphatpuffer verdünnt und innerhalb von 5 Minuten vermessen. Sollte der Partikeldurchmesser und das Zetapotential von einer Partikelpräparation bestimmt werden, so wurde zunächst der Partikeldurchmesser und im Anschluss das Zetapotential mit der gleichen Probe bestimmt.

3.2.9 Polymergehalt – Gaschromatographie

Die Bestimmung des Polymergehalts dient zur Bestimmung der Partikelausbeute. Die Partikelausbeute gibt den Prozentsatz der eingesetzten Monomermenge BCA an, die zu PBCA umgesetzt wurde und zur NP-Bildung beiträgt. Die PBCA-Konzentration wurde nach Verseifung der im Polymer enthaltenen Ester über den Butanolgehalt bestimmt.

3.2.9.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

1 N Natronlauge	Merck, Darmstadt
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
n-Butanol, p.A.	Merck, Darmstadt
n-Pentanol, p.A.	Fluka, Seelze
Natriumsulfat, wasserfrei	Merck, Darmstadt

Geräte:

Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
-------------	--------------------

GC-System:

GC:	HP5890 Series II	Hewlett-Packard, Bad Homburg
Integrator:	HP3396 A	
Säule:	Fused Silica Capillary Column, Permabon-FFAP-DF-0,1, 25 m x 0,25 mm ID	Machery-Nagel, Düren

Instrumentelle Parameter:

Injektor:	split / splitless HP 19251 – 60540, 250°C
Detektor:	FID, 250 °C
Ofen-Temperatur:	Gradient: 45 °C (3 min) → 10 °C (1/min) → 130 °C (4 min)
Gas:	
Aux gas:	Helium (Qualität 5.0)
Column flow:	1,0 ml / min
Split flow:	10,0 ml /min
Septum flow:	1,1 ml / min
Column + Aux:	35 ml / min
Column + Aux + Air :	430 ml / min
Column + Hydrogen + Aux:	65 ml / min
Column head pressure :	94 kPa

3.2.9.2 Probenvorbereitung, Messung

1 ml der NP Suspension wurde mit 1 ml 2 N NaOH versetzt und für 24 h im Thermomixer bei Raumtemperatur geschüttelt. 50 µl des Hydrolysats wurden mit 50 µl internem Standard (ca. 0,5 % (m/V) Pentanol in Wasser, genau gewogen) und 900 µl Wasser gemischt. 500 µl dieser Verdünnung wurden mit 1 ml Dichlormethan 2 min unter Schütteln extrahiert. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase unter Zusatz von wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. 1 µl der Probelösung wurde in den Gaschromatographen injiziert.

Zur Bestimmung des Polymergehalts der Proben wurden Kalibrierstandards erstellt, welche einen bekannten Butanolgehalt im Bereich von 0,5 – 12 mg/ml besaßen. Diese Lösungen wurden analog den Proben mit internem Standard versetzt und aufgearbeitet. Als Kalibriergrade wurde der BCA-Gehalt der Standards gegen das Verhältnis der Peakflächen Butanol / Pentanol aufgetragen. Vom Butanolgehalt zum BCA-Gehalt gelangt man durch Multiplikation des Butanolgehaltes mit dem Faktor 2,067 (BCA hat ein 2,067x höheres Molekulargewicht als Butanol).

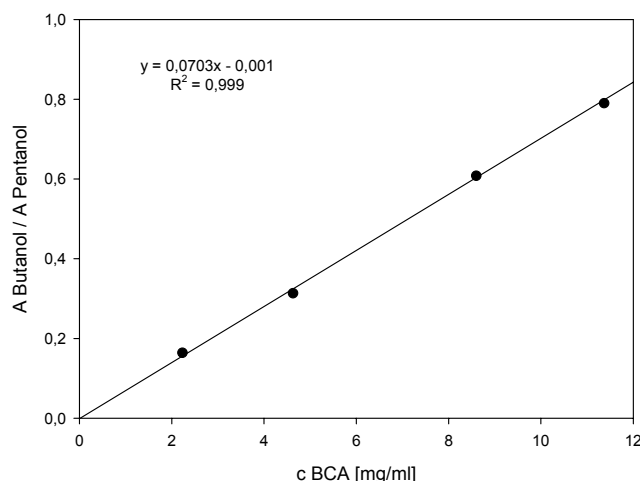


Abbildung 14- GC-Kalibriergerade für BCA

3.2.10 Gel-Permeations Chromatographie (GPC)

3.2.10.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Tetrahydrofuran (THF)	Merck, Darmstadt
PMMA-Standards (505 – 903.000 Da)	Polymer Standard Service, Mainz

GPC-System:

Pumpe:	Isochrom	Spectra Physics, San Jose, USA
Säule:	PSS SDV 100, 1000, 100.000 Å, (30 x 0,8 cm, I.D. 5 µm)	Polymer Standard Service, Mainz
Autosampler:	Triathlon	Spark Holland, Niederlande
Detektor:	RI-Detector	Shodex, Japan

3.2.10.2 Probenvorbereitung

Die Auftrennungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Friedhelm Gores beim Polymer Standard Service (PSS) in Mainz durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde ein Teil der NP-Suspension gefriergetrocknet und anschließend in einer Konzentration von ca. 10 mg/ml in THF gelöst. Einhundert Mikroliter dieser Lösung wurden in das

GPC-System injiziert und bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über drei in Reihe geschaltete Größenausschlußsäulen aufgetrennt. Als mobile Phase wurde THF verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Brechungsindexdetektor. Um das resultierende Elugramm in eine Molekulargewichtsverteilung umzurechnen, wurde die GPC mit Polymethylmethacrylat-Standards (500 – 903.000 Da) kalibriert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm WinGPC (PSS, Mainz).

3.2.11 MALDI-TOF Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

3.2.11.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Tetrahydrofuran (THF)	Merck, Darmstadt
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Fluka, Seelze

Massenspektrometer:

Voyager STR (MALDI-TOF-MS mit DE)	Applied Biosystems, Framingham, USA
Stickstoff-Laser, 337 nm	Laser Science, Franklin, USA

3.2.11.2 Probenvorbereitung

Analog zur Probenvorbereitung für die GPC wurde die Probe gefriergetrocknet und im Anschluss in wasserfreiem THF in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Diese Lösung wurde in einem Verhältnis von 1:4 (V/V) mit der Matrix-Lösung gemischt. Die Matrix-Lösung bestand aus 15 – 20 mg/ml DHB in THF. 0,5 µl dieser Mischung wurden auf einen Probenhalter aus Edelstahl aufgetragen und bei Raumtemperatur zu einem mikrokristallinen Film getrocknet.

Die Massenspektren wurden mit einem Voyager STR Massenspektrometer bei einer Wiederholungsrate von 3 bzw. 20 Hz (umschaltbar) aufgenommen. Zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung wurde das Gerät im Linearmodus mit 25 kV Beschleunigungsspannung betrieben. Um einzelne Fraktion besser aufzulösen, wurde der Reflektormodus mit 20 kV verwendet.

Üblicherweise wurden 1000 - 2000 Laser-Schüsse für ein Spektrum aufsummiert. Mit Hilfe der Software wurde das Rauschen der Spektren gefiltert und die Basislinie

leicht korrigiert. Die weitere Auswertung erfolgte mit der „Data Explorer“ Software des Geräteherstellers.

3.2.12 Off-Line Kopplung von GPC und MALDI-TOF MS

Die PBCA-Proben wurden mit Hilfe der Gel-Permeations-Chromatographie fraktioniert. Hierzu wurden dieselben GPC-Bedingungen - wie unter 3.2.10 beschrieben - verwendet, wobei am Auslass der Säule Fraktionen a 1 ml aufgefangen wurden. Diese Fraktionen wurden sodann mittels MALDI-TOF MS, wie bereits beschrieben, analysiert.

3.2.13 Berechnung des mittleren Molekulargewichts

Zur Berechnung des zahlenmittleren und gewichtsmittleren Molekulargewichtes (M_n bzw. M_w) und der Polydispersität (PD) anhand der MALDI-Spektren wurden die folgenden bekannten Formeln verwendet:

Formel 8 - zahlenmittleres Molekulargewicht, N_i : Anzahl der Moleküle mit der Masse M_i

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} M_i \cdot N_i}{\sum_{i=1}^{i=\infty} N_i}$$

Formel 9 - gewichtsmittleres Molekulargewicht, N_i : Anzahl der Moleküle mit der Masse M_i

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} M_i^2 \cdot N_i}{\sum_{i=1}^{i=\infty} M_i \cdot N_i}$$

Formel 10 - Polydispersität der Molekulargewichtsverteilung

$$PD = \frac{M_w}{M_n}$$

Im Falle der GPC, bei welcher das Produkt aus ($N_i \cdot M_i$) durch die Peakfläche A dargestellt wird, wurden die Formeln wie folgt adaptiert (El-Egakey 1983; Vansnick 1984):

Formel 11 – GPC: zahlenmittleres Molekulargewicht

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} A_i}{\sum_{i=1}^{i=\infty} \frac{A_i}{M_i}}$$

Formel 12 – GPC: gewichtmittleres Molekulargewicht

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} A_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^{i=\infty} A_i}$$

Nach (Lou 2000) kann mit Hilfe der Molekulargewichte der Fraktionen eines Polymers die Gesamtverteilung berechnet werden:

Formel 13 - Berechnung M_n der Gesamtverteilung, A : Peakfläche der GPC, j : Seriennummer der Fraktion, M_{nj} , M_{wj} : zahlenmittleres, gewichtmittleres Molekulargewicht gemäß MALDI-Daten
 A_j : korrespondierende Peakfläche in der GPC.

$$M_n = \frac{A}{\sum_{i=1}^{i=\infty} \frac{A_j}{M_{nj}}}$$

Formel 14 - Berechnung M_w der Gesamtverteilung

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} A_j \cdot M_{wj}}{A}$$

Die Gesamtfläche (A) unter der GPC-Kurve entspricht hierbei der Gesamtkonzentration an Polymer.

3.2.14 Arzneistoffbeladung mittels HPLC

Die Arzneistoffbeladung der PBCA-NP erfolgte auf indirektem Wege: Zunächst wurde der ungebundene Arzneistoff von den NP durch Filtration abgetrennt und im Anschluss die Konzentration an freiem Arzneistoff mittels HPLC bestimmt.

Die Arzneistoffbeladung konnte sodann nach Bildung der Differenz zwischen Gesamtgehalt und freiem Arzneistoffgehalt errechnet werden (siehe Formel 4).

3.2.14.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Material:

Zentrifugeneinheit	Millipore, Eschborn
(Ultrafree MC, 100,000 NMWL)	

Fließmittel:

70 % Milli-Q-Wasser	Millipore, Eschborn
30 % Acetonitril	Merck, Darmstadt
+ 0,1 % Trifluoressigsäure	Fluka, Seelze

HPLC-System:

Interface:	D-7000	
Pumpe:	D-7120	
Säule:	LiChroCart 250-4 mit LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)	Merck-Hitachi, Darmstadt
Autosampler:	D-7200	
Detektor:	D-7420, UV/VIS D-7480, Fluoreszenz	

HPLC-Parameter:

Injektionsvolumen:	20 µl
Flußrate:	0,8 ml / min
Detektion:	
- Absorption	$\lambda = 250 \text{ nm}$
- Fluoreszenz	$\lambda_{\text{ex}} 480 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} 560 \text{ nm}$

3.2.14.2 Probenvorbereitung

400 µl der NP Suspension wurden in eine Zentrifugeneinheit gegeben und 20 min bei 16.100 g zentrifugiert. 100 µl des Filtrats wurden mit 900 µl Milli-Q-Wasser verdünnt und in die HPLC eingespritzt. Die Konzentration wurde mit Hilfe einer Kalibriergeraden im Bereich von 25 µg/ml bis 250 µg/ml errechnet.

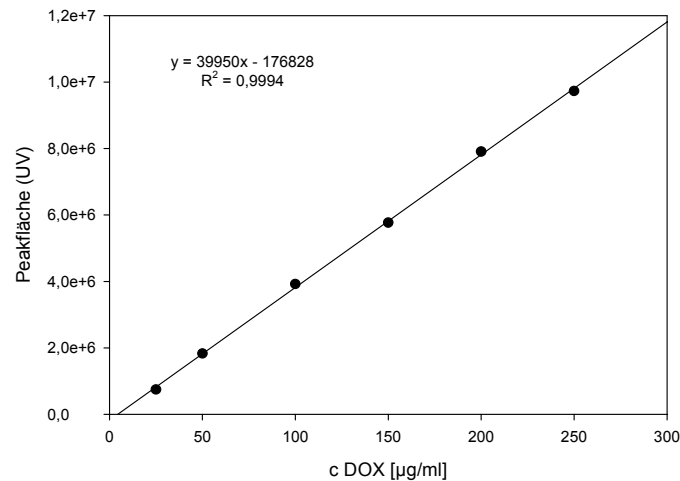


Abbildung 15 - HPLC-Kalibriergerade für Doxorubicin

3.2.15 Arzneistoffbeladung mittels UV/Vis

Die Bestimmung der Beladung von Phthalocyanin-NP und anderer mit Fluoreszenzmarkern beladener NP erfolgte mit Hilfe des DU-800-Photometers (Beckman Coulter, München). Hierzu wurde der freie Arzneistoff, wie unter 3.2.14 beschrieben abgetrennt und die Konzentration über die Absorption der Lösung mit Hilfe einer Kalibriergeraden errechnet.

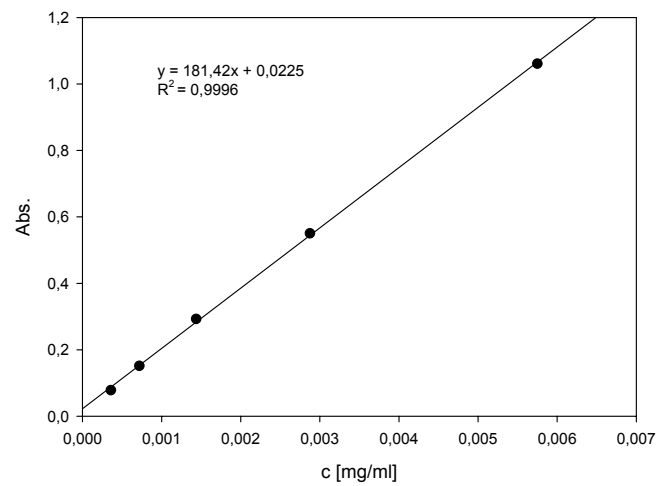


Abbildung 16 - Kalibriergerade für Al-Phthalocyanin

Die Ermittlung der Beladungsraten der anderen fluoreszenzmarkierten NP erfolgte analog zur Bestimmung der Phthalocyanine.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Makrophagen

3.3.1.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Leukozytenpräparation („buffy coat“)	Deutsches Rotes Kreuz, Frankfurt
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PAA, Cölbe
Ficoll-Trennlösung	Biochrom, Berlin
Teflon-Beutel (aus Biofolie 25)	Heraeus, Hanau
PHA (Phythämagglutinin)	Sigma, Steinheim
Interleukin-2	Chiron, Emeryville, USA

Makrophagen-Medium:

500 ml RPMI 1640 (ohne Glutamin)	Biochrom, Berlin
10 ml L-Glutamin [200 nM]	Gibco, Pasley, UK
5 ml Penicillin/Streptomycin [10.000 µg/ml]	Gibco, Pasley, UK
5 ml MEM Natriumpyruvat	Gibco, Pasley, UK
5 ml MEM nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
2 ml MEM Vitaminlösung	Invitrogen, Karlsruhe
20 ml AB-Serum, dekomplementiert	Universität Regensburg

Materialien und Geräte:

Falcon-Röhrchen 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Cytoperm Brutschrank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Avanti J-20	Beckman, München
LabTek II Chamber Slide, 4/8-well	Nunc, Wiesbaden
LabTek II Chambered Coverglass 4/8-well	Nunc, Wiesbaden

3.3.1.2 Isolierung von primären mononukleären Zellen

Primäre mononukleäre Zellen wurden aus Leukozyten-angereicherten Blutproben des Deutschen Roten Kreuzes isoliert. Die Monozyten wurden durch Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Zellen abgetrennt: Hierzu wurde die Blutprobe 1:2 mit PBS verdünnt und in einem Falcon-Röhrchen auf einen Ficoll-Gradienten aufgetragen. Dieses Röhrchen wurde 30 min bei 2000 Upm ohne Bremse und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Monozyten waren daraufhin in der Mitte des Röhrchens als weiße Bande zu erkennen. Diese Bande wurde isoliert und 2x durch Zentrifugation bei 1200 Upm (mit Bremse) und 4 °C mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Makrophagen mit Makrophagen-Medium auf eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Teflon-Beutel gegeben. Ihre Reifung zu Makrophagen erfolgte im Inkubator bei 7 % CO₂ und 37 °C während einer Woche. Die Isolierung der Zellen wurde am Georg-Speyer-Haus durch Frau Karin Becker-Peters und Frau Roswitha Seyd durchgeführt.

3.3.1.3 Isolierung und Kultivierung von Makrophagen

Eine Woche nach ihrer Isolierung wurden die Makrophagen aus der Zellsuspension in den Teflonbeuteln entnommen und in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Well in 4-Well Chamber Slides ausplattiert. Die Slides wurden für eine Stunde in den Brutschrank gegeben; daraufhin konnten die nicht adhärenierten Lymphozyten durch Waschen mit reinem RPMI 1640 entfernt werden. Die adhärenenten Makrophagen wurden bis zum Versuchsbeginn für weitere 2 Tage unter Zellkulturbedingungen mit Makrophagen-Medium kultiviert.

3.3.2 CaCo2 Zellkultur

Die CaCo2-Zelllinie ist eine humane Adenokarzinom-Zelllinie, welche als stark vereinfachtes Modell für die BHS genutzt werden kann. Die Zellen bilden in Kultur einen dichten Monolayer, mit engen Zell-Zell-Verbindungen aus und exprimieren eine Reihe von relevanten Efflux-Transportern der ABC-Familie.

3.3.2.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Chemikalien:

Trypsin-EDTA	Gibco, Pasley, UK
--------------	-------------------

CaCo2-Medium:

500 ml DMEM	Gibco, Pasley, UK
50 ml Fötale Kälberserum, inaktiviert	Gibco, Pasley, UK
10 ml L-Glutamin [200 nM]	Gibco, Pasley, UK
5 ml Penicillin/Streptomycin [10.000 µg/ml]	Gibco, Pasley, UK
5 ml MEM nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe

Materialien:

Zellkulturflaschen, 175 cm ²	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon-Röhrchen 15 ml	BD Biosciences, Heidelberg

3.3.2.2 Kultivierung von CaCo2-Zellen

Die CaCo2 Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausplattiert, im Inkubator kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 - 90 % gesplittet. Hierzu wurde das Zellkulturmedium von den Zellen entfernt und 1x mit PBS gewaschen. Die adhären Zellen wurden durch Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA für 5 min bei 37 °C (Inkubator) von der Flasche abgelöst und die entstandene Zellsuspension, zur Inaktivierung des Trypsins, in einem kleinen Falcon Röhrchen mit Zellkulturmedium versetzt. Die Zellen wurden 10 min bei 1400 Upm zentrifugiert, das Medium entfernt und in PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde erneut für 5 min bei 1400 Upm zentrifugiert, das PBS wurde von den Zellen abgezogen und das Pellet in Medium resuspendiert. Sodann wurden die Zellen in eine neue 175 cm² Zellkulturflasche ausplattiert. Das Medium wurde ca. alle 3 Tage ausgetauscht. Für die Zellaufnahmeversuche wurden die Zellen in Chamber Slides ausplattiert.

3.3.3 Versuche zur zellulären Aufnahme von Nanopartikeln

Die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel wurde mit Hilfe von primären Makrophagen und der CaCo2-Zelllinie untersucht. In Zusammenarbeit mit Frau Anke Schwedat und Frau Berta Sanchez de Juan wurden einzelne Versuche auch mit primären bovinen und porcinen Hirnendothelzellen sowie mit den Tumor-Zelllinien RG2 und 9L durchgeführt.

Zur Untersuchung wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, auf 4-Well- oder 8-Well-Chamber-Slides bzw. Chambered Cover Slides ausplattiert (ca. $2 - 4 \cdot 10^5$ Zellen pro Well) und zwei Tage unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Sodann wurden die Zellen 1x mit dem entsprechenden Zell-Medium gewaschen und die mit Zell-Medium verdünnte NP-Suspension aufgegeben. Üblicherweise wurden die NP in einer Polymerkonzentration von 15 – 250 µg/ml eingesetzt. Die Inkubationszeit variierte zwischen einer und vier Stunden. Nach Inkubation wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen um nicht aufgenommene Nanopartikel zu entfernen. In den meisten Fällen erfolgte eine Zellmembranfärbung unter Verwendung von Tetramethylrhodamin-Concanavalin A (150 µg/ml in PBS) oder Alexa 647-Concanavalin A (beide Invitrogen, Karlsruhe) für 2 Minuten. Abschließend wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen.

Im Falle von Chamber-Slides wurden die Zellen nach der Zellmembranfärbung durch Zugabe einer Paraformaldehyd-Lösung (4 % in PBS, Sigma, Steinheim) für 10 min fixiert. Nach Entfernen der Paraformaldehyd-Lösung wurden die Objektträger mit Vectashield „Hardset“ Eindeckmedium (Vector, Burlingame, USA) versiegelt und die Objektträger mit Deckgläschen versehen.

Bei Verwendung von Chambered Cover Slides wurden die Wells nach der Zellmembranfärbung mit je 500 µl PBS befüllt um die Zellen vor Austrocknung zu schützen und konnten ohne weitere Fixierung oder Versiegelung mit dem CLSM betrachtet werden.

3.3.3.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die CLSM-Aufnahmen wurden mit einem Leica DM IRBE-Mikroskop angefertigt (Leica Microsystems, Mannheim). Das Mikroskop war mit einem 20x und 63x Immersionsobjektiv ausgestattet. Zur Anregung wurde ein Argon/Neon-Laser mit den Wellenlängen 488, 545 und 633 nm eingesetzt. Das Fluoreszenzsignal wurde mit einem Leica TCS SL-Scanner erfasst und über die Leica Confocal Software V 2.61 ausgewertet. Für die Aufnahmen von lebenden Zellen wurde das Objekt mit Hilfe einer beheizbaren Box auf 37°C temperiert (the cube / the box, Life Imaging Services, Reinach, Schweiz).

3.4 Chemotherapie

Um die Wirksamkeit der Zytostatika-beladenen Nanopartikel zu untersuchen wurde eine experimentelle Chemotherapie an tumortragenden Ratten durchgeführt. Die Chemotherapie wurde am Institut für Humane Morphologie in Moskau, Russland durchgeführt.

3.4.1 Tiere

Der Behandlungsversuch erfolgte an männlichen Glioblastom-tragenden Outbred Wistar Ratten. Vor und während des Versuchs wurden die Tiere bei einem konstanten Tag/Nacht-Rhythmus unter Laborbedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere für eine Woche akklimatisiert. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug bei Versuchsbeginn 250 ± 40 g.

Die Versuche wurden unter Berücksichtigung der russischen Richtlinien für Tierversuche durchgeführt und waren durch das russische Gesundheitsministerium autorisiert.

3.4.2 Implantation des Tumors

Das verwendete 101/8 Glioblastom wurde ursprünglich durch die lokale Injektion von DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracen) in das Cerebellum von Ratten erzeugt. Für diesen Versuch wurde tiefgefrorenes Tumormaterial in den rechten lateralen Ventrikel von betäubten Ratten eingebracht. Nach Auftreten deutlicher Symptome für einen Gehirntumor wurden diese Ratten getötet und das Gehirn entnommen. Der Tumor dieser Ratten wurde herauspräpariert und etwa 10^6 Tumorzellen wurden auf gleiche Weise in das Gehirn frischer Versuchstiere implantiert.

3.4.3 Behandlungsschema

Die Ratten wurden zufällig in Gruppen mit je 10 Tieren eingeteilt und erhielten an den Tagen 2, 5 und 8 nach der Tumorimplantation entsprechend ihrem Körpergewicht jeweils 1,5 mg/kg Doxorubicin in der entsprechenden Zubereitungsform als intravenöse Injektion in die Schwanzvene. Nach 100 Tagen wurden die langzeitüberlebenden Tiere getötet und obduziert. Das verwendete Behandlungsschema basiert auf Vorarbeiten von Gelperina et al. und Steiniger et al. In ihren Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Gabe von 4,5 mg/kg (3 x 1,5 mg/kg) Doxorubicin am vielversprechendsten ist (Gelperina 2002; Steiniger 2004).

Tabelle 4 - Übersicht über die Zubereitungen für die Chemotherapie

1	Doxorubicin-Lösung
2	Doxorubicin-Lösung + F68
3	Doxorubicin-Lösung + P85
4	Doxorubicin-Lösung + L61
5	Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP + F68
6	Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP + P85
7	Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP + L61
8	Dextran-stabilisierte leere NP + Doxorubicin + PS80 (Mischung direkt vor der Injektion)
9	F68-stabilisierte Doxorubicin-NP
10	F68-stabilisierte Doxorubicin-NP + PS80
Alle Zubereitungen waren auf einen Doxorubicingehalt von 2 mg/ml eingestellt. Die Tensidkonzentration betrug 1% (m/V)	

Die Daten der folgenden Zubereitungen wurden aus der Arbeit von Dr. Sebastian Steiniger entnommen:

Tabelle 5 - Zubereitungen aus Publikation Steiniger

A	Doxorubicin-Lösung + PS80
B	Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP
C	Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP + PS80

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung aller Messdaten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaStat 2.03 von Access Softek Inc. (San Rafael, CA, USA). Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Der Fehler ist als absolute Standardabweichung angegeben. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde der One way Anova-Test mit der Option nach Tukey verwendet. Werte mit $P < 0,050$ wurden als signifikant betrachtet.

4 HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER NANOPARTIKEL

4.1 Dichte und Viskosität der Nanopartikelsuspensionen

Die Kenntnis über die Viskosität der Nanopartikelsuspension ist insbesondere für die Größenbestimmung mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung und der analytischen Ultrazentrifuge von großer Bedeutung. In der nachfolgenden Tabelle sind die ermittelten Dichten und Viskositäten der verwendeten Tensidlösungen und NP-Zubereitungen bei 20 °C angegeben:

Tabelle 6 - Dichten und Viskositäten von Tensidlösungen und NP-Zubereitungen

	Dichte [kg / m ³]	Kinematische Viskosität [m ² / s]	Dynamische Viskosität [mPa * s]
Milli-Q	0,9982	0,987 ± 0,009	0,985 ± 0,009
Pluronic® F68 1%	0,9997	1,278 ± 0,027	1,278 ± 0,027
Polysorbat 80 1%	-	1,120 ± 0,01	-
PBCA-Dex 1%	-	1,239 ± 0,007	-
PBCA-Dex 1% + 3% Mannitol	-	1,321 ± 0,019	-
PBCA-F68 1% + 3% Mannitol	-	1,289 ± 0,037	-
PBCA-Dex 0,5% + 1,5% Mannitol	1,0045	1,118 ± 0,012	1,123 ± 0,012
PBCA-F68 0,5% + 1,5% Mannitol	1,0071	1,115 ± 0,032	1,123 ± 0,032

Zum Vergleich: Der Literaturwert für die dynamische Viskosität von Wasser beträgt: 1,008 mPa * s. Der systematische Fehler dieser Bestimmungsmethode dürfte somit unter 3 % liegen.

4.2 Freies Formaldehyd in Nanopartikelsuspensionen

Bei Betrachtung der Polymerstruktur von PBCA erscheint die Abspaltung von Formaldehyd durch eine Retro-Aldol-Addition möglich (Leonard 1966). In der Literatur finden sich Berichte, dass der abgespaltene Formaldehyd für die Toxizität des Trägersystems verantwortlich ist (Tseng 1990). Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen wurde die Konzentration an freiem Formaldehyd in Anlehnung an die Methode des Europäischen Arzneibuchs bestimmt.

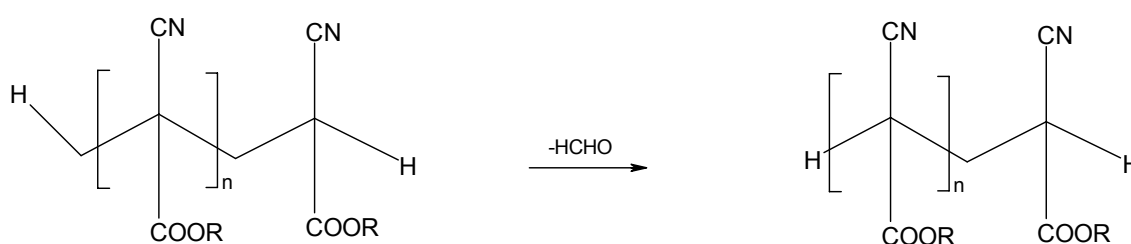


Abbildung 17 - Abspaltung von Formaldehyd aus PBCA, R = C₄H₉

Da die Umsetzung der Probe mit dem Nash-Reagenz unter Umständen die Abspaltung von weiterem Formaldehyd begünstigt, wurden die Partikel bei einem Teil der Proben durch Zentrifugation abgetrennt. Untersucht wurde hier nur der Überstand, der bereits freigesetzten Formaldehyd enthält.

Tabelle 7 - Freier Formaldehyd in NP-Suspension

	Freier Formaldehyd [µg/ml]
Komplette NP-Suspension	12,1 µg/ml
Überstand der NP Zubereitung	1,5 µg/ml

Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung: Ist während der Bestimmung des freien Formaldehyds PBCA zugegen, so wird zusätzlicher Formaldehyd aus den Polymerketten freigesetzt. Die Bestimmung führt zu falsch erhöhten Ergebnissen.

Um eine längere Lagerzeit der Partikel zu simulieren, wurde ein Stresstest durchgeführt: Die NP Suspension wurde 1 h bei 60 °C gehalten und anschließend der freigesetzte Formaldehyd bestimmt. Die Abspaltung des gasförmigen Formaldehyds ist unter erhöhten Temperaturen begünstigt.

Tabelle 8 - Freier Formaldehyd in NP-Suspension, nach Stresstest

	Freier Formaldehyd [µg/ml]
Komplette NP-Suspension	27,5 µg/ml
Überstand der NP Zubereitung	17,3 µg/ml

Alle untersuchten, ungestressten Proben lagen unter dem Grenzwert (20 µg/ml HCHO) des Europäischen Arzneibuchs für freien Formaldehyd in Impfstoffen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten früheren Studien, in denen ebenfalls nur eine geringe Menge an freiem Formaldehyd nachgewiesen werden konnte (Kreuter 1984). Die Toxizität des Trägersystems scheint somit nicht allein auf den freigesetzten Formaldehyd zurückzuführen zu sein.

Die später durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen des Polymers konnten zeigen, dass Formaldehyd abgespalten wird, welcher jedoch nur zu einem sehr geringen Teil frei vorliegt. Der Großteil des freigesetzten Formaldehyds scheint wieder an das andere Ende der Polymerkette addiert zu werden (siehe auch 4.4.2.).

4.3 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung des mittleren Partikeldurchmessers

Nanopartikel, welche zur intravenösen Applikation gedacht sind, sollten eine Größe von unter 200 nm besitzen, um die Gefahr einer Embolie zu verringern und die Sterilfiltration (0,22 μm) zu ermöglichen. Aus diesen Gründen und im Sinne einer routinemäßigen Qualitätskontrolle ist es wichtig, den Partikeldurchmesser der hergestellten kleinpartikulären Trägersysteme genau zu bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur Größenbestimmung untersucht: (1) Dynamische Lichtstreuung (DLS), (2) Analytische Ultrazentrifugation (AUZ), (3) Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), (4) Raster-Elektronenmikroskopie (REM) und (5) Raster-Kraft-Mikroskopie (RKM).

4.3.1 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), welche in der Pharmazeutischen Technologie häufig auch als Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) bezeichnet wird, liefert als Endergebnis einen mittleren Partikeldurchmesser und einen so genannten Polydispersitätsindex (PI), welcher Auskunft über die Breite der Partikelgrößenverteilung gibt. Als primäre Größe erhält man mit Hilfe der DLS eine Verteilung des Diffusionskoeffizienten (D), welche sich mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung zu einer Verteilung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers (d_h) umrechnen lässt (vgl. 2.4.1.). Während einer durchschnittlichen Messzeit von 300 Sekunden werden ca. 40 Millionen Partikel klassifiziert.

Vor der Messung muss die Probe 1:20 verdünnt werden, um die freie Bewegung der Partikel zu ermöglichen. Durch diese Verdünnung wird der Tensidgehalt von 1 % auf 0,05 % erniedrigt.

Um den Einfluss der Tensidkonzentration auf die Partikelgrößenverteilung zu überprüfen, wurden Messungen ohne und mit Korrektur des Tensidgehalts durchgeführt. Eine typische Größenverteilung Pluronic-stabilisierter NP ist in Abbildung 18 dargestellt:

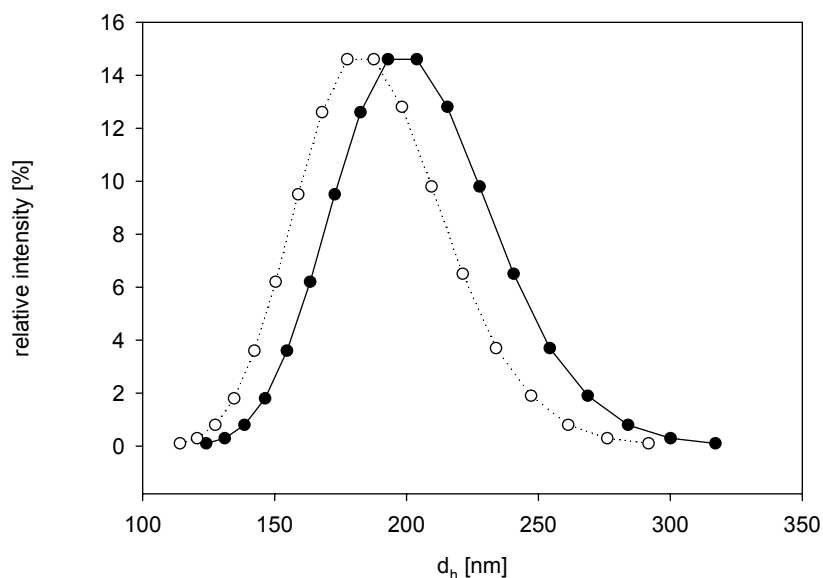


Abbildung 18 - DLS: Verteilung des (hydrodynamischen) Durchmessers d_h der PBCA-NP in 0,05 % (schwarz) oder 1 % (weiß) Pluronic® F68.

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser bei einer Tensidkonzentration von 1 % beträgt 184 ± 28 nm, bei 0,05 % Pluronic® F68 199 ± 28 nm.

Dieser Unterschied in der mittleren Partikelgröße bei unterschiedlichen Tensidkonzentrationen könnte durch eine Agglomeration von Partikeln bei erniedrigter Tensidkonzentration oder geändertem hydrodynamischen Verhalten in Abhängigkeit der Tensidkonzentration zurückzuführen sein. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass der Unterschied lediglich durch zufällige Variabilität der Proben zu begründen ist ($P = 0,548$).

4.3.2 Analytische Ultrazentrifugation

Im Gegensatz zu anderen nanopartikulären Zubereitungen (Vogel 2002; Langer 2003), ist die Sedimentation der PBCA-NP in wässrigem Medium genügend langsam, um sie ohne Zusatz von viskositätserhöhenden Hilfsstoffen mittels Analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) zu vermessen.

4.3.2.1 Bestimmung der Größe von PBCA-NP

In Abbildung 19a ist die radiale Absorptionsverteilung der NP-Suspension aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Sedimentationsfront von Lauf zu Lauf voran schreitet. Abbildung 19b stellt die mit Hilfe des Programms „Sedfit“ berechnete Verteilung des Sedimentationskoeffizienten dar.

Die Form der Verteilung zeigt deutlich, dass sich die Größenverteilung etwas komplexer darstellt, als die DLS Messung vermuten lässt: Neben einer Hauptpopulation mit einem $s_{20,w}$ -Wert um 2800 S sind auch zwei langsamer sedimentierende Populationen ($s_{20,w}$ 1000 u. 2000 S) zu erkennen.

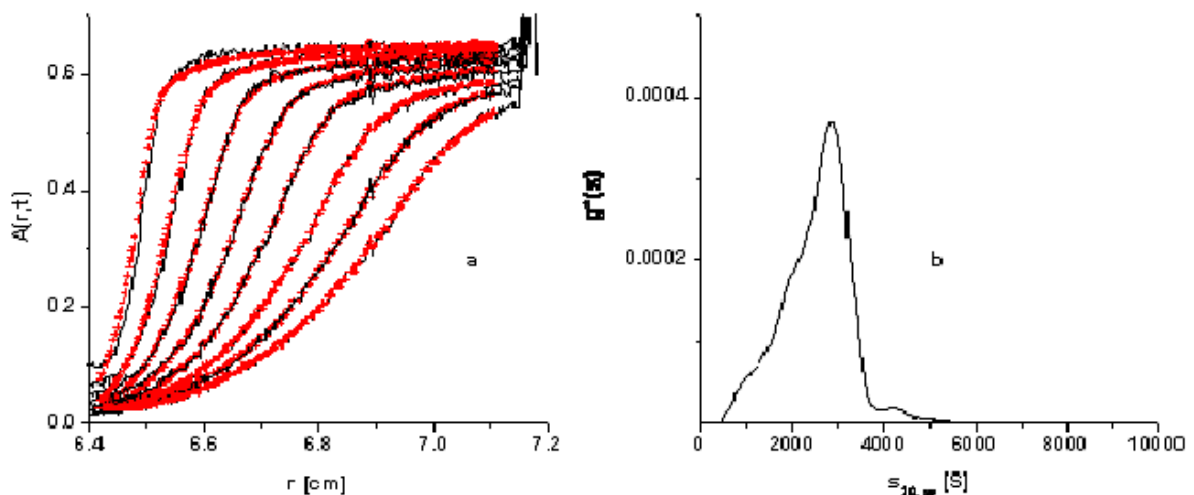


Abbildung 19 - Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit von PBCA-NP mit 0,05 % Pluronic® F68 - (a) Absorption der NP-Suspension $A(r,t)$ vs. Radius r ; (b) korrespondierende Verteilung des Sedimentationskoeffizienten $g^*(s_{20,w})$

Zusätzlich finden sich geringe Mengen an schneller sedimentierendem Material. Insgesamt ist die Verteilung jedoch deutlich weniger heterogen als bei anderen Nanopartikel-Zubereitungen, die bereits mittels AUZ charakterisiert wurden (Vogel 2002; Langer 2003).

Da es sich, wie REM und TEM gezeigt haben, um feste sphärische Partikel handelt, können die ermittelten $s_{20,w}$ -Werte mit Kenntnis der Dichte (siehe 4.3.2.2) in eine Verteilung des Partikeldurchmessers umgerechnet werden („solid sphere model“).

Analog zu den DLS-Messungen wurde die Zubereitung mit 0,05 % und mit 1 % Pluronic® F68 vermessen. Mit der verminderten Tensidkonzentration war ein mittlerer Durchmesser von 185 ± 38 nm zu erkennen, während mit 1% Pluronic® F68 eine mittlere Größe von 184 ± 30 nm zu detektieren war.

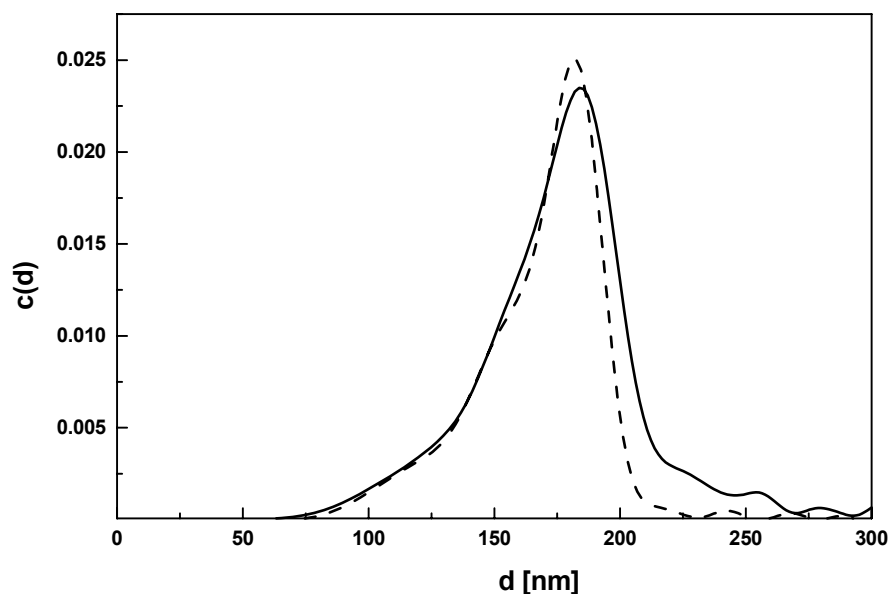


Abbildung 20 - Resultierende Partikelgrößenverteilung nach Berechnung mit dem „solid sphere“ Model. (—) 0,05 % bzw. 1 % (----) Pluronic® F68.

Eine geringe Verzerrung der Größenverteilung ergibt sich aus der Tatsache, dass größere Partikel eine andere Lichtstreuung und somit Trübung als kleinere Partikel zeigen. Da es sich bei dem vermessenen Partikelsystem jedoch um relativ eng verteilte Größen handelt, ist dieser Fehler als gering einzuschätzen (Vogel 2002).

4.3.2.2 Bestimmung der Dichte von PBCA-NP

Die Dichte der Nanopartikel wurde über die Schwimmdichte ermittelt. Hierzu wurden die Nanopartikel in verschiedenen Mischungen aus $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, und somit unterschiedlicher Dichte, zentrifugiert. Die ermittelten Sedimentationskoeffizienten dieser Zentrifugationen sind in der nachfolgenden Abbildung gegen die Dichte des Mediums aufgetragen.

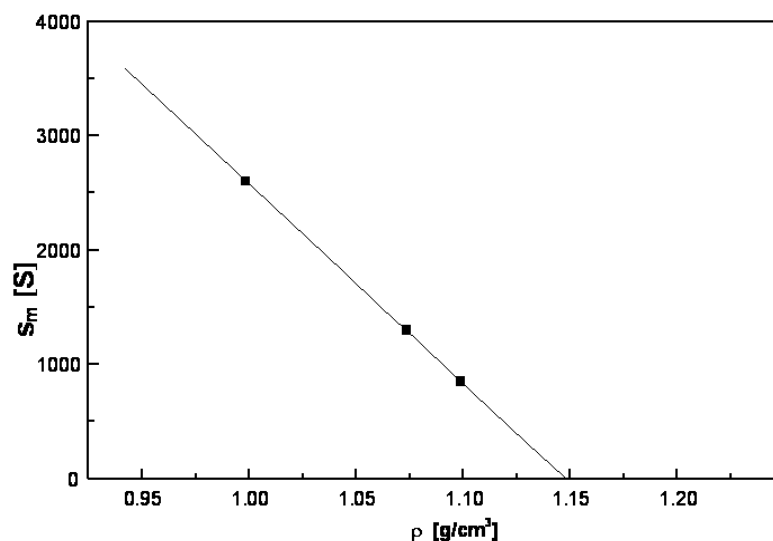


Abbildung 21 - Bestimmung der Dichte von Pluronic[®] F68-stabilisierten PBCA-NP in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Mischungen mit 0,9% (m/m) NaCl: Sedimentationskoeffizient s_m gegen die Dichte des Lösungsmittels

An dem Punkt, an dem die Dichte des Lösungsmittels gleich der Dichte der Partikel ist, findet keine Sedimentation mehr statt. Durch Extrapolation auf $s_m = 0$ konnte die mittlere Dichte der NP abgelesen werden. Sie beträgt $\rho = 1,148 \text{ g/cm}^3$.

Die ermittelte Dichte der PBCA-NP zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Dichte anderer NP auf Basis von Polyalkylcyanoacrylat. Vauthier et al. bestimmten die Dichte von Poly(isobutylcyanoacrylat)-NP und Poly(2-ethylbutylcyanoacrylat)-NP durch Dichtegradientenzentrifugation in Saccharose-Lösungen. Die Dichten, dieser chemisch eng verwandten Polymerpartikel betragen $\rho = 1,140 \pm 0,007 \text{ g/cm}^3$ bzw. $\rho = 1,10 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$ (Vauthier 1999).

4.3.2.3 Berechnung der molaren Massen der NP

Mit Kenntnis der Dichte und des Diffusionskoeffizienten der NP kann über die Svedberg-Gleichung (vgl. Formel 5) die mittlere molare Masse der NP berechnet werden. Sie liegt bei ca. $2,5 \cdot 10^9$ g/mol.

Berechnet man ausgehend von der bestimmten Dichte der NP von $1,148 \text{ g/cm}^3$, einer Partikelmasse von $2,5 \cdot 10^9$ Da und der Annahme einer dichten Kugel den theoretischen Durchmesser eines Partikels so gelangt man zu einem Wert von 190 nm, welcher sehr nahe am gemessenen Radius von 199 nm liegt.

Tabelle 9 - Vergleich untersuchte NP vs. Theorie (feste Kugel)

	PBCA-NP 22/10/02 Stabilisator: 1% Pluronic® F68	Theorie: Dichte, kugelförmige Partikel
Sedimentations coeff. [S]	2700	2852
Durchmesser [nm]	198,8 (hydrodynamischer D.)	190,4 (theoretischer D.)
Dichte der NP [g/cm^3]	1,148	1,148
Viskosität Medium [$\text{mPa}\cdot\text{s}$]	1,0145	1,0145
Dichte Medium [g/cm^3]	1,0042	1,0042
Masse der Partikel [Da]	$2,5 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^9$

Bei einem mittleren Molekulargewicht der Polymerketten von 2500 g/mol (vgl. 4.4.) besteht ein Nanopartikel aus ca. einer Million agglomerierter Polymerketten.

Ein Milliliter einer Nanopartikelsuspension mit einem Gehalt von 10 mg/ml PBCA enthält $4 \cdot 10^{-12}$ Mol NP, sprich $2,4 \cdot 10^{12}$ NP. Geht man von einem Modellnanopartikel mit einem Durchmesser von 200 nm und einer Oberfläche³ von $0,13 \text{ } \mu\text{m}^2$ aus, so besitzen die NP in einem Milliliter Suspension die Gesamtoberfläche von ca. 300 cm^2 .

³ Berechnet über die Oberfläche einer Kugel: $A = 4\pi r^2$

4.3.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Transmissions-Aufnahmen wurden von Herrn Prof. Wolburg am Institut für Pathologie der Universität Tübingen erstellt.

Die verwendeten PBCA-NP wurden mit Dextran als Stabilisator hergestellt. Für einzelne Aufnahmen wurden die Nanopartikel zur Erhöhung ihrer Elektronendichte mit Cobalt-Phthalocyanin (PcCo) beladen.

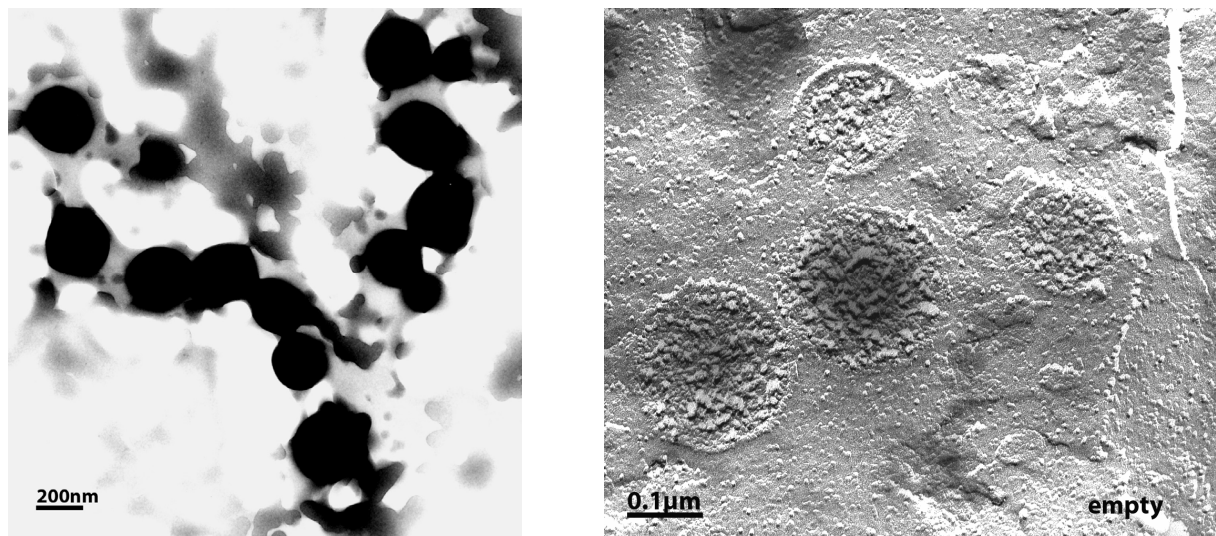


Abbildung 22 – TEM: PBCA-Nanopartikel mit PcCo, kontrastiert mit Uranylacetat (links)
TEM: unbeladene PBCA-Nanopartikel nach Gefrierbruch (rechts)

In den TEM-Aufnahmen ist die sphärische Form der Partikel zu erkennen. Die Auswertung mehrerer elektronenmikroskopischer Aufnahmen liefert eine mittlere Partikelgröße um 200 nm. Die Gefrierbruchtechnik ermöglicht einen Blick in das innere der Nanopartikel. In Abbildung 22 (rechts) ist die raue Struktur der NP, welche durch die agglomerierten Polymerketten entsteht, gut zu erkennen.

Aufgrund der aufwendigen Probenvorbereitung wurde dieses Verfahren nicht für die routinemäßige Größenbestimmung der Nanopartikel herangezogen, gleichwohl es Aufschluss über die Morphologie und die Größe der Arzneistoffträger liefert.

4.3.4 Raster-Elektronenmikroskopie

Ähnlich wie die TEM, erlaubt die REM auch Aussagen über die Morphologie der Nanopartikel. Die nachfolgende Abbildung zeigt eine typische Probe Dextran-stabilisierter Nanopartikel nach Gefriertrocknung und Bedampfung.

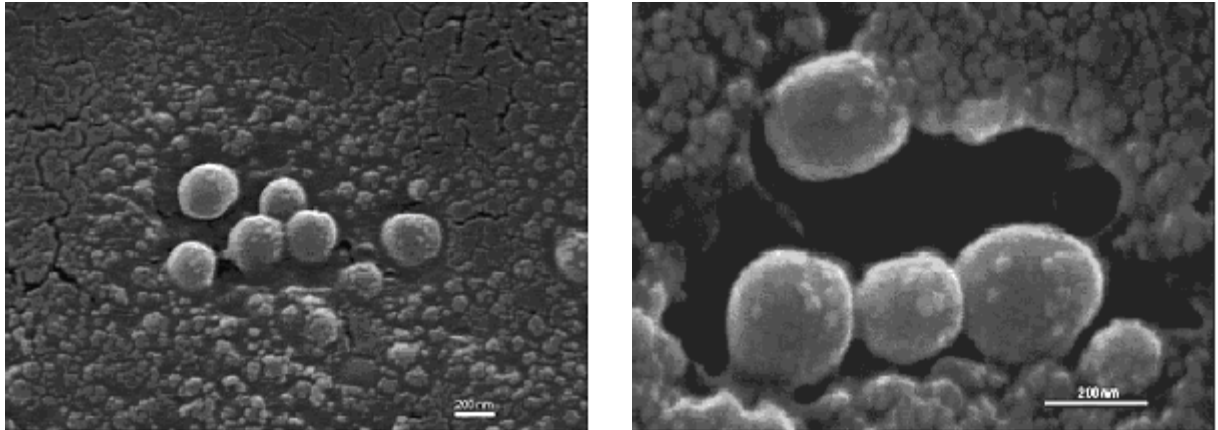


Abbildung 23 – REM-Aufnahmen von Dextran-stabilisierten PBCA-NP. Maßstab 200 nm.

Die Struktur auf der Oberfläche der Nanopartikel, welche zunächst eine raue NP-Oberfläche vermuten lässt, stammt von dem als Stabilisator verwendeten Dextran 70.000. Dieses Makromolekül legt sich während der Gefriertrocknung als zusätzliche Schicht über die NP und den Probenhalter.

Insbesondere im Vergleich mit Pluronic®-stabilisierten NP (siehe Abbildung 24) wird deutlich, dass diese markante Oberflächenstruktur auf den Stabilisator zurückzuführen ist. Wie in der Abbildung zu erkennen ist finden sich bei F68 keine flockigen Feinstrukturen, weder auf den Partikeln, noch im Probenhintergrund.

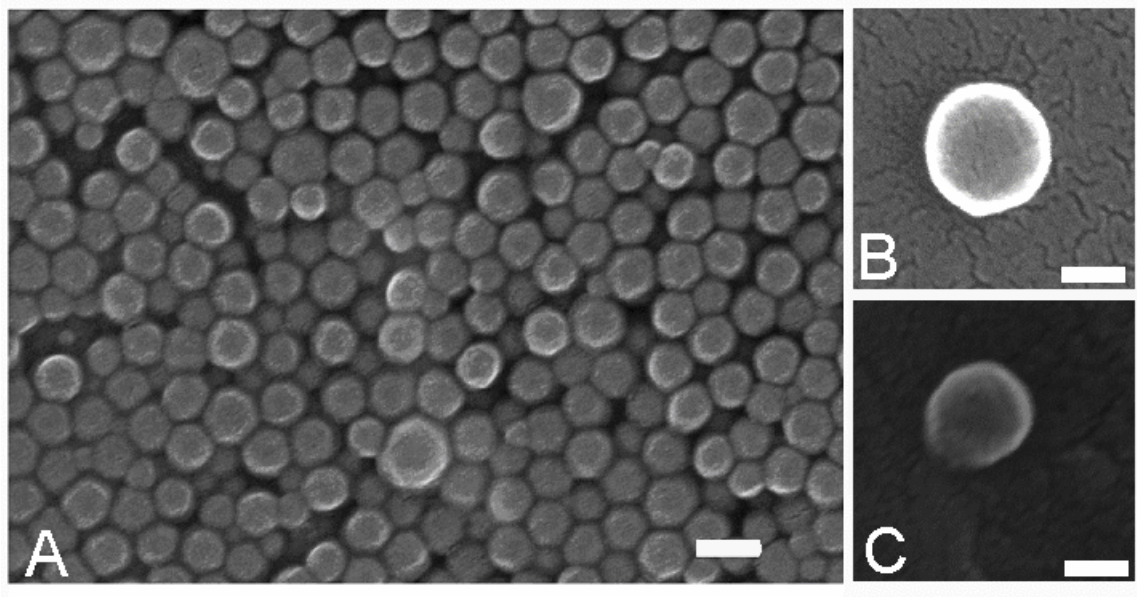


Abbildung 24 - REM Aufnahme Pluronic-stablisierter NP: (A) Dicht gepackte NP einheitlicher Größe; (B) und (C) isolierte Partikel bei stärkerer Vergrößerung. Maßstab (A) 200 nm; (B) und (C) 100 nm

Deutlich zu erkennen ist die nahezu perfekte sphärische Form und die enge Größenverteilung der Pluronic®-stabilisierten NP. Um aus den mikroskopischen Aufnahmen eine Größenverteilung zu berechnen, wurde die Größe von 156 Nanopartikeln mit Hilfe der Grafiksoftware „PaintShop pro“ bestimmt.

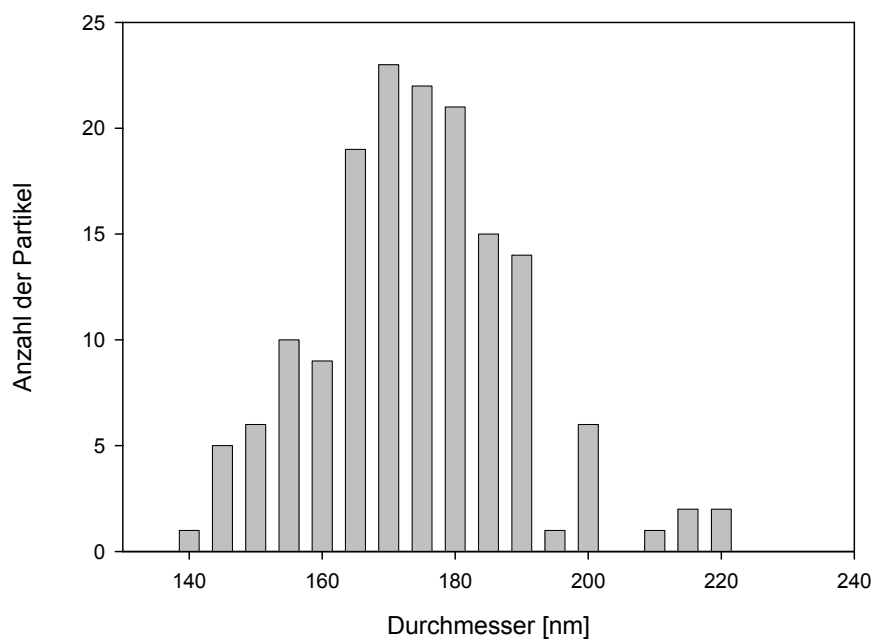


Abbildung 25 - REM: Resultierende Größenverteilung

Zu erkennen ist eine relativ enge Partikelgrößenverteilung: Über 90 % der Partikel liegen im Bereich zwischen 145 – 190 nm. Der mittlere Durchmesser beträgt 167 ± 16 nm.

4.3.5 Raster-Kraft-Mikroskopie

Die Raster-Kraft-Mikroskopie (RKM, atomic force microscopy, AFM) gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Charakterisierung nanoskaliger Strukturen. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die Proben nahezu unverändert, d.h. ohne aufwendige Probenvorbereitung, betrachtet werden können. Hierdurch wird auch die Gefahr der Artefaktbildung minimiert.

Die nachfolgende Abbildung zeigt zwei typische RKM-Aufnahmen Pluronic® F68-stablisierter NP.

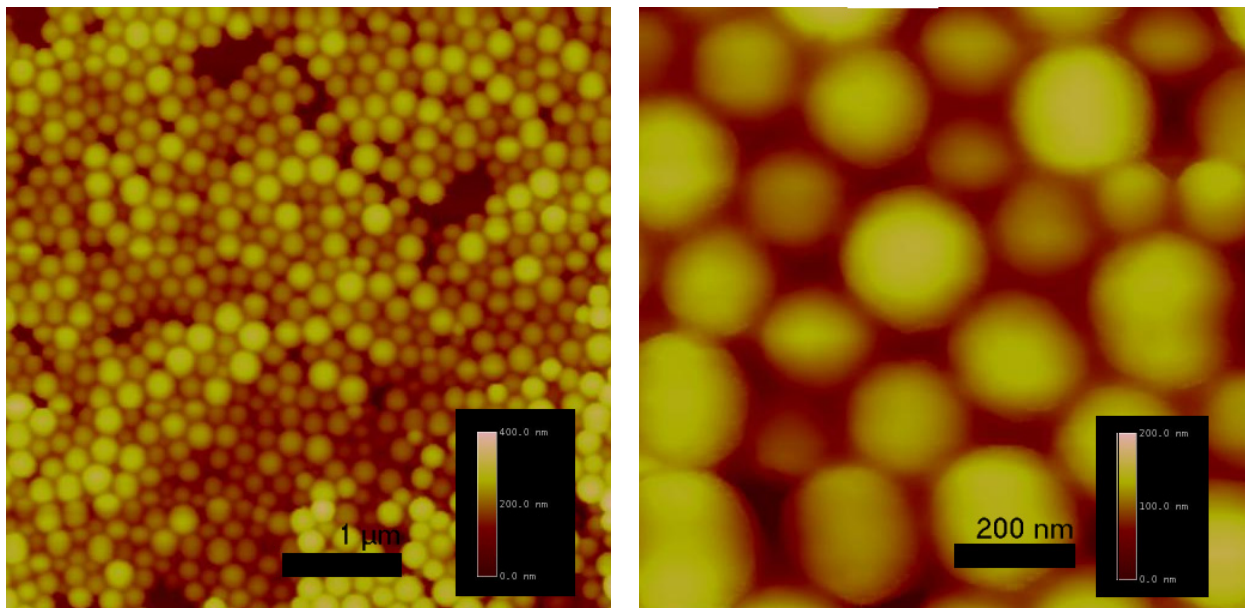


Abbildung 26 - RKM Aufnahmen von PBCA-NP

Die oben gezeigten Aufnahmen wurden analog zu den REM-Messungen mit Hilfe der Grafiksoftware ausgewertet und die nachfolgende Größenverteilung erstellt ($n = 107$).

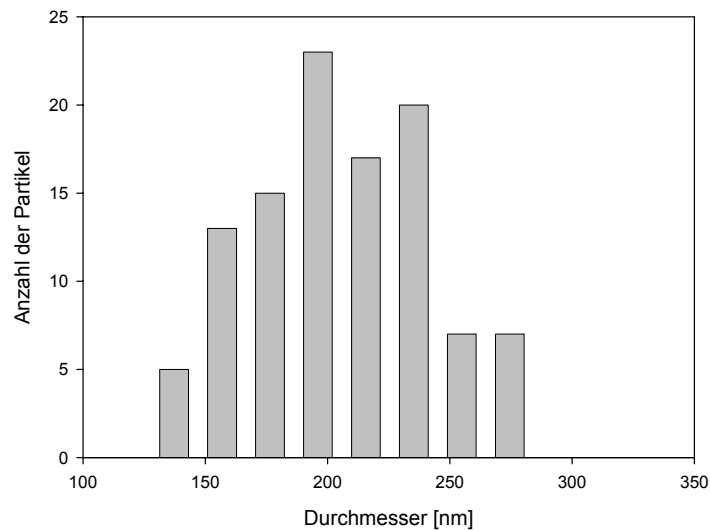


Abbildung 27 - RKM: Resultierende Größenverteilung

Der mittlere Durchmesser beträgt 205 ± 36 nm. (Die absoluten Werte der RKM-Messung sind mit den DLS, REM und AUZ-Werten nicht direkt vergleichbar, da die Bestimmung mit einer anderen Charge NP durchgeführt wurde). Einzelne Aufnahmen bei stärkerer Vergrößerung (s. Abb. 28) zeigen eine Feinstruktur der PBCA-Nanopartikel. Es scheint, als wären die NP mit einer Größe von ca. 200 nm aus kleineren NP aufgebaut, die selbst eine Größe von unter 50 nm besitzen.

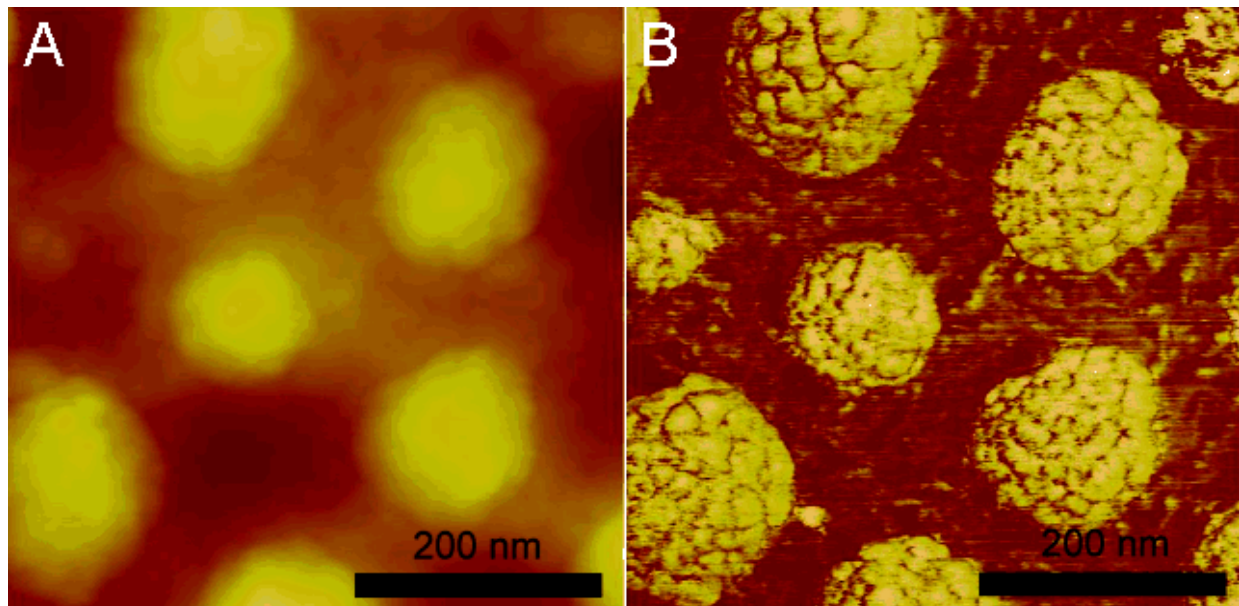


Abbildung 28 - AFM: PBCA-NP bei starker Vergrößerung
(A) übliche RKM-Darstellung (Höhe), (B) Phase Imaging, Maßstab 200 nm

Diese Ergebnisse zur Feinstruktur waren jedoch nicht reproduzierbar. Eventuell tritt eine solche Feinstruktur nur bei gealterten Partikeln auf, die unter bestimmten Bedingungen gelagert wurden oder es handelt sich um ein Artefakt.

Im Gegensatz zu den anderen mikroskopischen Verfahren, sind bei der RKM auch Messungen in Suspension, d.h. ohne jegliche Probenvorbereitung, möglich. Allerdings erscheinen die PBCA-NP zu weich, um eine Messung in Suspension zu erlauben. Es wurden keine akzeptablen Bilder erhalten.

Alle hier gezeigten RKM-Aufnahmen stammen von PBCA-Proben, welche durch Gefriertrocknung auf einem Objektträger fixiert wurden.

4.3.6 Abschließende Bewertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Verfahren zur Größenbestimmung von Nanopartikeln untersucht: (1) Dynamische Lichtstreuung (DLS), (2) Analytische Ultrazentrifugation (AUZ), (3) Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), (4) Raster-Elektronenmikroskopie (REM) und (5) Raster-Kraft-Mikroskopie (RKM). Von diesen fünf Techniken liefern die drei mikroskopischen Verfahren die direkteste Information über die Morphologie der Partikel. Alle drei Verfahren zeigen, dass es sich bei den PBCA-NP um sphärische Körper mit einer Größe um 200 nm handelt. Bei TEM und REM ist die Gefahr der Artefakt-Bildung durch die Probenvorbereitung am Größten: Die Partikel können während des Trocknungsprozesses schrumpfen, agglomerieren oder durch die Bedampfung und Auflagerung von Gold bei der REM größer erscheinen.

Zur Bestimmung der Größe eignen sich die mikroskopischen Verfahren nur bedingt. Es können gleichzeitig immer nur wenige hundert Nanopartikel betrachtet und deren Größe bestimmt werden. Da sich in einem Milliliter NP-Suspension mit einem Gehalt von 10 mg/ml etwa 2400 Milliarden Partikel befinden, erscheint die Stichprobe bei der TEM, REM und RKM als zu klein, um verlässliche Aussagen über die wahre Größenverteilung zu treffen.

Die Zahl der ausgewerteten Nanopartikel ist bei der dynamischen Lichtstreuung und der analytischen Ultrazentrifugation deutlich größer. So werden z.B. bei einer DLS Messung von 300 Sekunden etwa 40 Millionen Partikel erfasst. Beide Verfahren eignen sich folglich deutlich besser zur Bestimmung des mittleren Partikeldurchmessers. Voraussetzung für alle hier durchgeführten Berechnungen ist, dass es sich um sphärische Partikel handelt, was durch die mikroskopischen Verfahren gezeigt werden konnte.

Da die Sedimentation der Partikel in der Zentrifuge eine größere Abhängigkeit von der Größe zeigt als ihre Diffusion während der DLS Messung, besitzt die AUZ eine höhere Auflösung als die Lichtstreuung. Zusätzlich zur Größeninformation liefert die AUZ noch Hinweise auf die Dichte des untersuchten Partikelsystems und macht so weitere Berechnungen, wie z.B. die Berechnung des mittleren Molekulargewichts eines Partikels oder die Berechnung der Anzahl der Partikel pro Volumen möglich.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über den mittleren Partikeldurchmesser der verwendeten Partikelchargen mit Ausnahme der TEM:

Tabelle 10 - Übersicht: Bestimmung des mittleren Partikeldurchmessers mit verschiedenen Verfahren

	Charge 1	Charge 2
DLS	184 ± 28 nm	233 ± 26 nm
AUZ	184 ± 30 nm	-
REM	167 ± 16 nm	-
RKM	-	205 ± 36 nm

Alle untersuchten Methoden geben Aufschluss über die Morphologie, den Aufbau und die Größe, sowie die Größenverteilung unseres Partikelsystems. Alle Verfahren zeigen, dass es sich bei den untersuchten Nanopartikeln um Körper mit einem Durchmesser von 180 – 230 nm handelt. REM und RKM liefern im Vergleich zu DLS und AUZ signifikant kleinere Partikeldurchmesser, was bereits von anderen Autoren beobachtet wurde (Douglas 1984). Im Unterschied zu den mikroskopischen Verfahren wird bei DLS und AUZ die Größe des hydratisierten Partikels bestimmt,

welcher durch die angelagerte Solvathülle einen größeren (hydrodynamischen) Durchmesser besitzt.

Für die routinemäßige Untersuchung der Nanopartikelsuspensionen erscheint der Einsatz der DLS am vorteilhaftesten, da es sich hierbei um eine relativ günstige und schnell durchführbare Methode handelt, die bei sphärischen und eng verteilten Proben zu verlässlichen Ergebnissen führt.

4.4 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung des mittleren Molekulargewichts der Polymerketten

Bei der Charakterisierung von Nanopartikeln beschränkte man sich bisher häufig auf die Bestimmung des mittleren Partikeldurchmessers und der Partikelausbeute. Allerdings finden sich in aktuellen Publikationen zunehmend weitere Informationen über die physikochemischen Eigenschaften der hergestellten Trägersysteme.

Neben dem Zetapotential und der Beladungsrate ist insbesondere das mittlere Molekulargewicht des Polymers von Interesse. So kann über die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts der Polymerketten die Reproduzierbarkeit eines Polymerisationsverfahrens und die Identität des Polymers dokumentiert werden, was im Hinblick auf eine industrielle Produktion der Arzneiform Nanopartikel und der Anwendung am Menschen von Interesse ist. Die Molekulargewichtsverteilung eines Polymers wird durch die Parameter zahlenmittleres Molekulargewicht (M_n), gewichtsmittleres Molekulargewicht (M_w) und Polydispersität (PD) beschrieben, welche durch direkte und indirekte Methoden zugänglich sind.

Die vorliegende Studie vergleicht die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gel-Permeations-Chromatographie und der MALDI-TOF Massenspektrometrie. Alle hierzu durchgeführten Experimente wurden mit Pluronic® F68-stabilisierten Nanopartikeln durchgeführt.

4.4.1 Gel-Permeations-Chromatographie

Das Molekulargewicht von Nanopartikeln, oder genauer gesagt das Molekulargewicht der Polymerketten, aus denen sich Nanopartikel bilden, wird häufig durch Gel-Permeations-Chromatographie bestimmt (Bentele 1983; El-Egakey 1983; Balthasar 2005). Hierzu werden die Nanopartikel in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. Tetrahydrofuran) aufgelöst und über eine Säule anhand ihrer Größe chromatographisch aufgetrennt.

Kleinere Moleküle zeigen hierbei ein größeres Verteilungsvolumen und werden später eluiert als größere Moleküle, welche sich zu einem geringeren Ausmaß in den Poren der Trennsäule verteilen können und früher eluiert werden.

In Abbildung 29 ist ein typisches Elugramm einer PBCA-Probe dargestellt. Gut zu erkennen ist die Zusammensetzung der Probe aus mehreren Oligomeren, die durch Schultern und teilweise getrennte Peaks (28 – 31 ml) zu identifizieren sind. Die Hauptfraktion des Polymers wird zwischen 23 und 32,5 ml eluiert, wobei das Maximum bei 25,6 ml liegt. Die kleineren Hügel um 17,5 ml sind wahrscheinlich auf geringe Mengen an hochpolymeren Verbindungen zurückzuführen; der ausgeprägte Peak bei 34 ml ist der Injektionspeak.

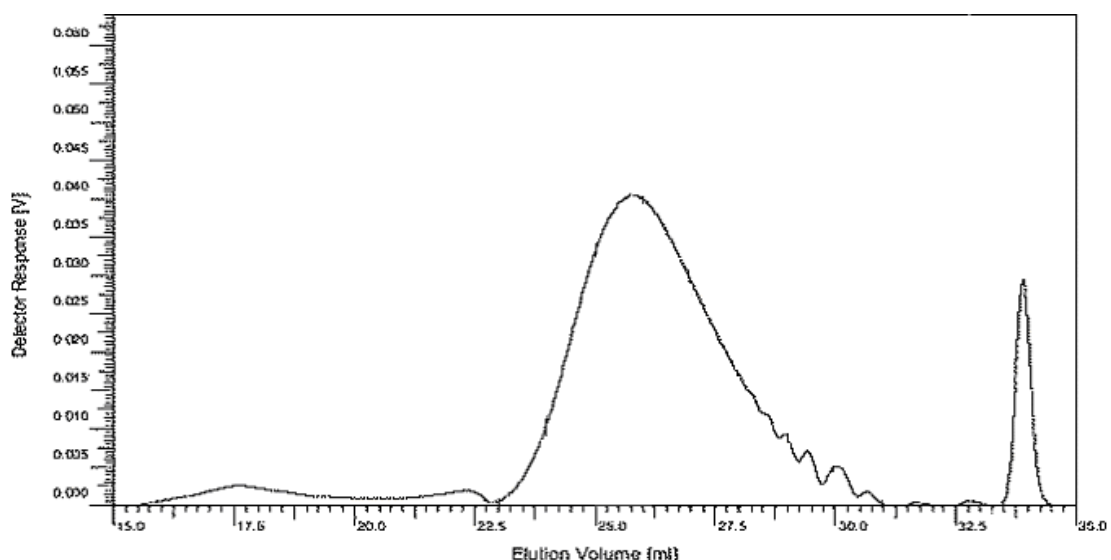


Abbildung 29- GPC: Elugramm von PBCA

Dieses Elugramm wurde mit Hilfe einer durchgeführten Kalibrierung mit Polymethylmetacrylat (PMMA) in eine Molekulargewichtsverteilung umgerechnet. Die Intensität des Detektors in der GPC ist direkt proportional zur Konzentration des Polymers.

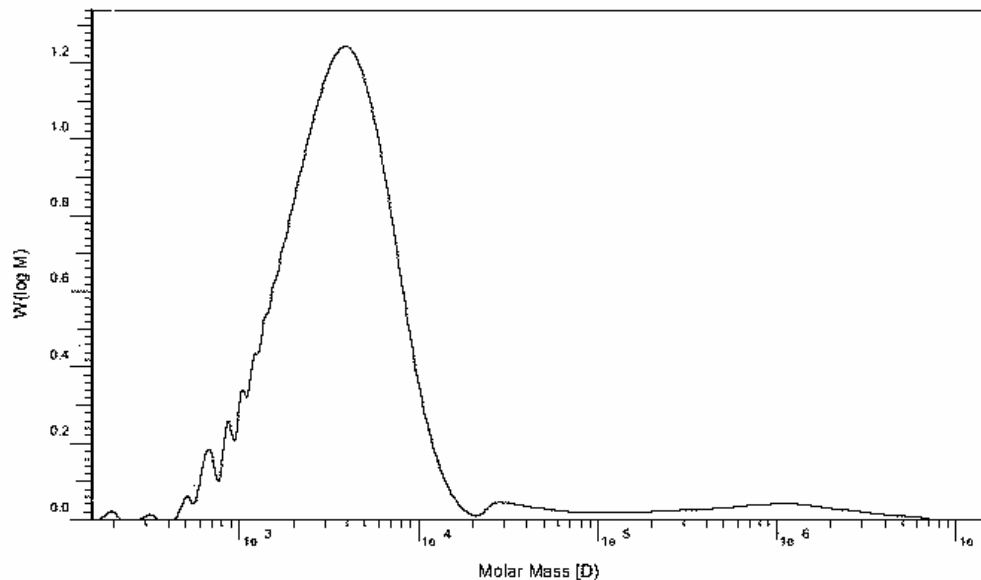


Abbildung 30 – GPC: Molekulargewichtsverteilung von PBCA, Kalibrierung mit PMMA-Standard.

Die Molekulargewichtsverteilung der dargestellten Probe bewegt sich im Bereich zwischen 500 und 20.000 Da und zeigt ein relatives Maximum bei 4180 Da.

Mit Hilfe der unter 3.2.13 eingeführten Formeln errechnen sich die mittleren Molekulargewichte zu $M_n = 2540$ Da, $M_w = 4130$ Da und die Polydispersität zu 1,625.

Zu beachten ist, dass es sich bei dieser Umrechnung nur um eine Näherung handeln kann. Da kein Standard für das Polymer Poly(butylcyanoacrylat) kommerziell verfügbar ist, wurde die Kalibrierung mit Hilfe von Poly(methylmethacrylat) durchgeführt. PBCA und PMMA sind zwar chemisch verwandt, zeigen jedoch ein leicht unterschiedliches hydrodynamisches Volumen und besitzen somit auch ein leicht unterschiedliches Elutionsverhalten.

4.4.2 MALDI-TOF MS

Während die Gel-Permeations-Chromatographie relativ häufig zur Charakterisierung von Nanopartikeln eingesetzt wird, spielt die Massenspektrometrie in diesem Bereich noch eine eher untergeordnete Rolle. Dies ist in erster Linie sicherlich durch den hohen Investitionsaufwand für ein solches Spektrometer zu begründen. Neben der höher aufgelösten Molekulargewichtsverteilung liefert das Massen-Spektrum einer Substanz auch Informationen über die chemische Struktur der untersuchten Probe.

Unter den verschiedenen Verfahren der Ionisierung und Auftrennung der Probe hat die hier verwendete Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) stark an Bedeutung gewonnen. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine „weiche“ Ionisierung ohne nennenswerte Fragmentierung oder Degradation und eine gute Auftrennung der Probe in einem breiten Massenbereich aus (Karas 1987; Spickermann 1996). Bei der MALDI-TOF MS wird die zu untersuchende Substanz mittels Kokristallisation aus einem geeigneten Lösungsmittel in eine UV absorbierende Matrix eingebettet. Durch Beschuss mit einem gepulsten Laser werden Teile der Probe desorbiert, ionisiert und anhand ihrer Molmasse (bzw. m/z) aufgetrennt. Bei TOF erfolgt die Auftrennung der Probe anhand der benötigten Flugzeit (Time-of-Flight) bis zum Detektor, welche von der Masse (m) und der Ladung (z) der Partikel abhängig ist. Da bei der MALDI fast ausschließlich einfach – hier durch Na^+ -Anlagerung positiv – geladene Teilchen erzeugt werden, ist die Partikelmasse direkt proportional zum Quadrat der Flugzeit.

Ein typisches Massenspektrum von PBCA ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Im Gegensatz zum Chromatogramm der GPC sind hier die einzelnen Oligomere als isolierte Signale zu erkennen. Die erkennbare Oligomerverteilung reicht von 650 Da (4-mer) bis weit über 12.500 Da. Die maximale Peakintensität ist bei 2035 Da zu erkennen, was dem 13-mer entspricht.

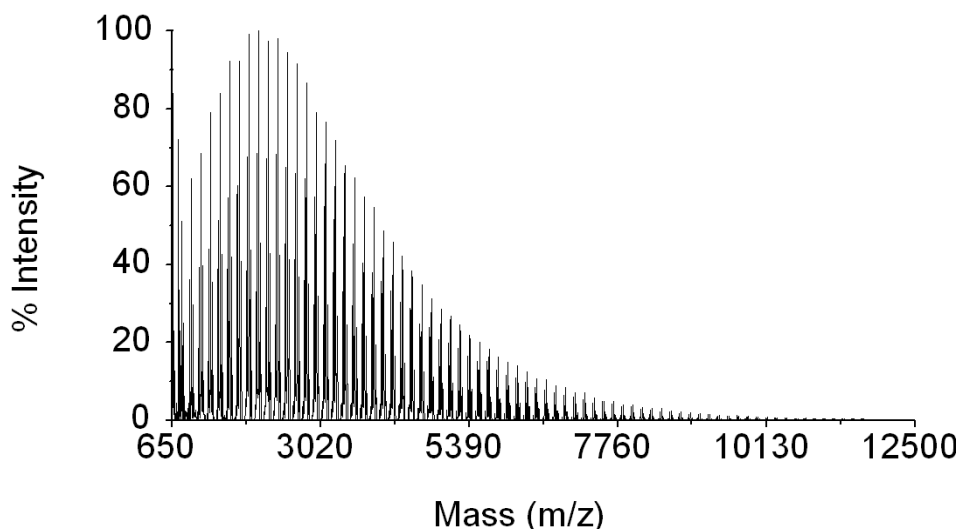


Abbildung 31 – MALDI-TOF MS: Spektrum der PBCA-NP (Linearmodus)

Für die Berechnung des mittleren Molekulargewichts mit Hilfe der unter 3.2.13 eingeführten Formeln wurde nur der Massenbereich von 650 - 10.500 Da verwendet, da im unteren Massenbereich zahlreiche Matrix-Ionen stören und bei höheren Massen das Signal/Rausch-Verhältnis zu gering ist. Es errechnen sich die mittleren Molekulargewichte zu $M_n = 2723$ Da und $M_w = 3534$ Da mit einer Polydispersität (PD) von 1,30.

Die Reproduzierbarkeit der Messung wurde durch Messung an 5 verschiedenen Stellen der Probenpräparation sichergestellt. Die relative Standardabweichung des zahlenmittleren Molekulargewichts war kleiner 5 %.

Zusätzlich zur Molekulargewichtsverteilung liefert die Massenspektrometrie Informationen über die chemische Struktur des Polymers, über die absolute Masse der Oligomere und die Massenabstände zwischen den einzelnen Oligomeren. Bereits in Abbildung 31 wird deutlich, dass neben der aus dem Reaktionsmechanismus (vgl. Abbildung 5) zu erwartenden Massenverteilung $[n \text{ BCA} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+]$ noch zwei weitere Polymerverteilungen existieren. Die nachfolgende Abbildung zeigt einen detaillierteren Ausschnitt des 10-mers, welcher im Reflektormodus aufgenommen wurde. Neben dem erwarteten Hauptpeak bei 1571,3 $[10 \times 153 + 18 + 23 = 1571]$ finden sich zwei weitere Signale mit einer Massendifferenz von ± 30 Da.

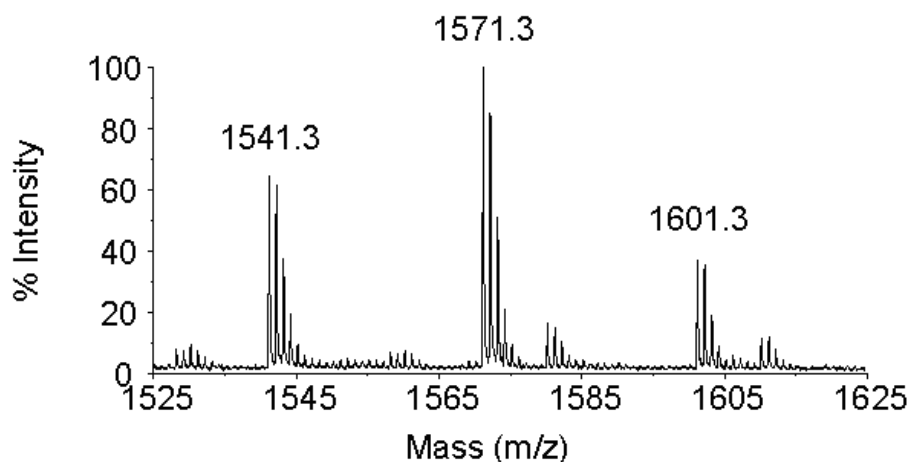


Abbildung 32 – MALDI-TOF MS: Vergrößerte Darstellung des 10-mers (Reflektormodus)

Der Peak mit einer um 30 Da verminderten Masse lässt sich leicht durch die Abspaltung von Formaldehyd vom Polymer erklären, welche bereits intensiv diskutiert worden ist (Leonard 1966; Kreuter 1984; Tseng 1990). Das Signal bei 1601,3 Da stammt vermutlich von einem „regulären“ Molekül der Oligomerverteilung, welches freien Formaldehyd an das CH-acide Ende addiert hat. Durch eine Aldol-Addition kommt es zu einer Kettenverlängerung und zu einer Massenzunahme von 30 Da.

Das nachfolgende Reaktionsschema verdeutlicht die Abspaltung des Formaldehyds und die Addition des freigesetzten Aldehyds an das gegenüberliegende CH-acide Ende der Kette:

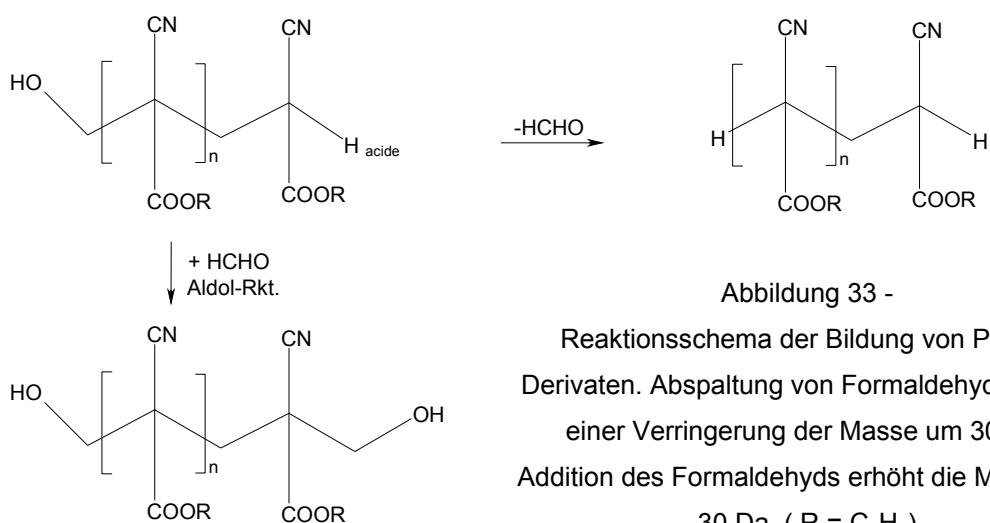


Abbildung 33 -

Reaktionsschema der Bildung von PBCA-Derivaten. Abspaltung von Formaldehyd führt zu einer Verringerung der Masse um 30 Da. Addition des Formaldehyds erhöht die Masse um 30 Da. (R = C₄H₉)

Diese Interpretation deckt sich mit dem bei der GPC-MS Kopplung (vg. 4.4.3) festgestellten unterschiedlichen Elutionsverhalten der drei Polymerserien. Hier wird das lipophilste (M-30) Polymer schneller eluiert als das reguläre Polymer, während die (M+30)-Polymerserie, welche aufgrund der zwei Hydroxyfunktionen eine erhöhte Hydrophile besitzt, eine stärkere Interaktion mit der hydrophilen Säule zeigt und später eluiert wird.

4.4.2.1 Einfluss des pH-Werts auf die chemische Zusammensetzung

Die Emulsionspolymerisation von Butylcyanoacrylat wird durch geringe Mengen an Hydroxid-Ionen (OH^-) gestartet. Um den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Starter-Molekülen auf die chemische Zusammensetzung des Polymers näher zu untersuchen, wurden Pluronic® F68-stabilisierte Zubereitungen im Bereich von pH 1 - 3 hergestellt und in Bezug auf Partikeldurchmesser, Partikelausbeute und mittlerem Molekulargewicht der Polymerketten charakterisiert.

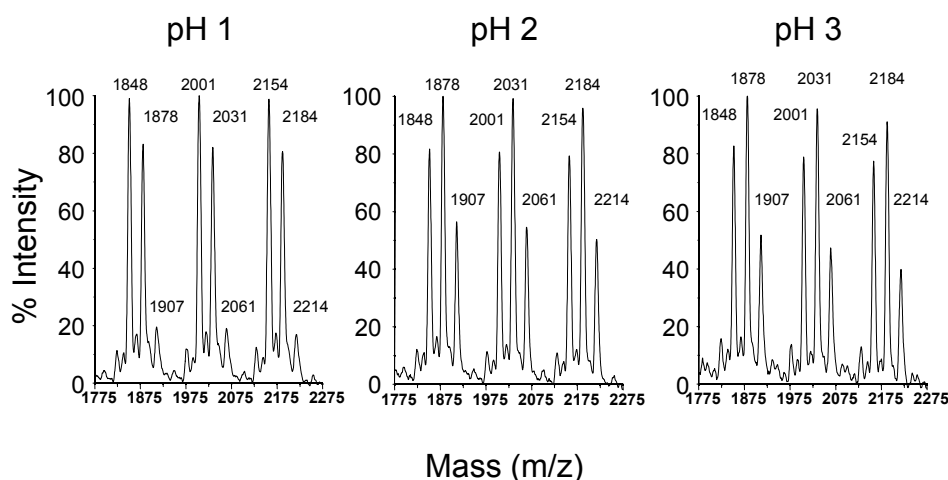


Abbildung 34 – MALDI-TOF MS: Ausschnitte der Massenspektren (12 – 14-mer) von PBCA-Zubereitungen bei unterschiedlichem pH

Abbildung 34 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus drei charakteristischen Massenspektren von PBCA, welches bei unterschiedlichem pH polymerisiert wurde. Während das Peakmuster bei pH 2 und 3 mit einem (M-30)/(M)/(M+30)-Verhältnis von ungefähr 75/100/50 fast identisch ist, sind bei der Probe mit pH 1 signifikante Unterschiede zu erkennen. Hier nimmt die Intensität des (M+30)-Peaks deutlich ab,

während die Intensität des (M-30)-Peaks so stark zunimmt, dass dieser zum stärksten Peak wird, das Peakverhältnis verändert sich zu 100/80/20. Diese Veränderung kommt wahrscheinlich durch die begünstigte Abspaltung von Formaldehyd bei stark erniedrigtem pH durch eine Retro-Aldol-Addition zustande.

Bei der Betrachtung der Parameter Partikeldurchmesser, Partikelausbeute und mittlerem Molekulargewicht fällt auf, dass Partikelausbeute und mittleres Molekulargewicht mit zunehmendem pH-Wert sinken, während die Polydispersität der Molekulargewichtsverteilung steigt.

Tabelle 11 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften von PBCA-NP bei unterschiedlichem pH

	Durchmesser [nm]	Polydispersität der Größenverteilung	Partikelausbeute [%]	Zahlenmittleres Molekulargewicht M_n [Da]	Gewichtsmittleres Molekulargewicht M_w [Da]	Polydispersität der Massenverteilung
pH 1	182 ± 7	0,011	56 ± 4	2455 ± 110	3078 ± 88	1,25 ± 0,02
pH 2	212 ± 5	0,038	46 ± 1	2301 ± 79	2983 ± 72	1,30 ± 0,02
pH 3	174 ± 10	0,061	25 ± 6	2095 ± 85	2843 ± 102	1,36 ± 0,01

Die Reduktion der Partikelausbeute und der Anstieg der Polydispersität der Molekulargewichtsverteilung kann durch die schnellere Polymerisation bei erhöhtem pH-Wert erklärt werden. Mit steigender Hydroxid-Ionen-Konzentration wird die Polymerisation durch eine steigende Anzahl an Molekülen gestartet und verläuft dadurch schneller, aber letztlich auch unkontrollierter, wobei Polymerketten mit stark unterschiedlicher Länge entstehen. Bei OH^- Konzentrationen über pH 3 kommt es zu einer stark beschleunigten Reaktion und zur Ausbildung von hochmolekularen Polymeren ($M_r > 100.000$ Da), welche sich mittels MALDI-TOF MS nur noch schwer erfassen lassen, aber in der GPC zu detektieren sind. Diese langkettigen Polymere scheinen nicht zur Ausbildung von Nanopartikeln beizutragen, was auch die geringere Partikelausbeute erklären würde.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Partikelgröße und pH-Wert konnte auch nach ausführlicher Wiederholung der Versuche nicht gezeigt werden. In der Literatur finden sich der Hinweise, dass die Partikelgröße bei pH 2 ein Minimum aufweist (Douglas 1984), was in unserer Studie jedoch nicht reproduziert werden konnte. Die Bedeutung der Monomerkonzentration, des Stabilisators und der

Rührgeschwindigkeit scheint deutlich größeren Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften der NP zu haben (Douglas 1984; Vansnick 1984).

4.4.2.2 Vergleich Sicomet® – Indermil™

Das zur Herstellung der Nanopartikel auf Basis von Poly(butylcyanoacrylat) benötigte Monomer Butylcyanoacrylat ist auf dem Markt unter verschiedenen Handelsnamen erhältlich. Alle Produkte werden vom Henkel-Konzern hergestellt, unterscheiden sich jedoch in der Reinheit und in den zugesetzten Stabilisatoren (Nicolaisen 2005).

Bereits seit längerem ist BCA unter dem Namen Sicomet® 6000 (Sichel-Werke, Hannover) und Histoacryl® (B. Braun, Melsungen) im Handel. Beide Monomere enthalten Schwefeldioxid (SO₂) als Stabilisator. Sicomet® 6000, welches vor allem im technischen Bereich Anwendung findet, enthält neben 4 – 5 ppm SO₂ keine weiteren Hilfsstoffe. Histoacryl® enthält deutlich mehr Stabilisator und ist sterilfiltriert, da es als Gewebekleber in der Chirurgie Anwendung findet. Relativ neu auf dem Markt ist der Gewebekleber Indermil™ (Loctite, USA), welcher neben ca. 80 ppm SO₂ noch einen weiteren organischen Stabilisator enthält, der eine Sterilisation des fertigen Produkts mit γ -Strahlung ermöglicht.

Durch die hohen Stabilisatorkonzentrationen erscheinen die Monomere Histoacryl® und Indermil™ für eine direkte Emulsionspolymerisation ungeeignet, da sich die benötigte Polymerisationszeit durch die Stabilisatoren von wenigen Stunden hin zu mehreren Tagen verlängert. Allerdings eignet sich Indermil sehr gut zur Produktion von reinem PBCA, welches dann durch Nanopräzipitation zu NP umgesetzt werden kann. Während das Sicomet-Monomer bei niedrigen pH-Werten polymerisiert werden muss, um eine kontrollierte Polymerisation zu erreichen, kann Indermil™ - aufgrund der durch die Stabilisatoren verzögerten Polymerisation - direkt in Milli-Q-Wasser eingebracht werden, um kurzkettige Polymerketten zu erhalten (siehe auch 3.1.3). Die durch diese unterschiedlichen Methoden hergestellten Polymere unterscheiden sich auch im Aufspaltungsmuster ihrer Molekülmassenverteilung:

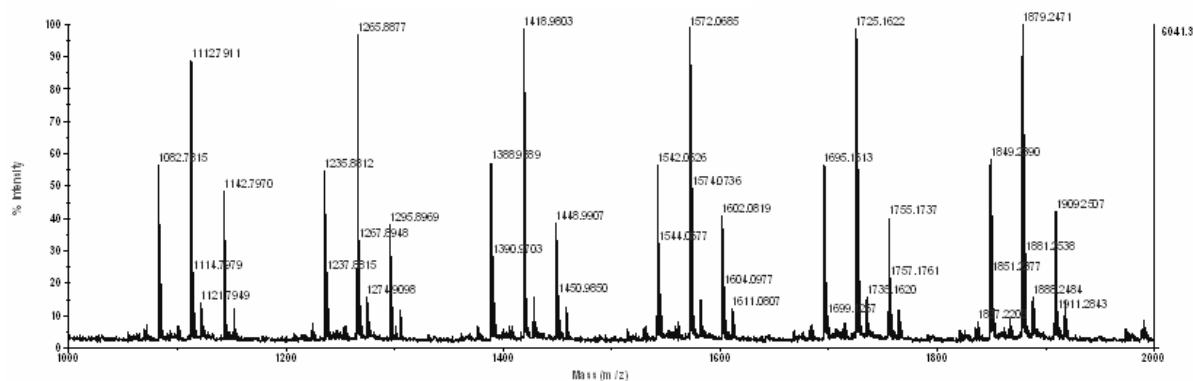


Abbildung 35 - MS Spektrum des Sicomet®-Polymers (Ausschnitt)

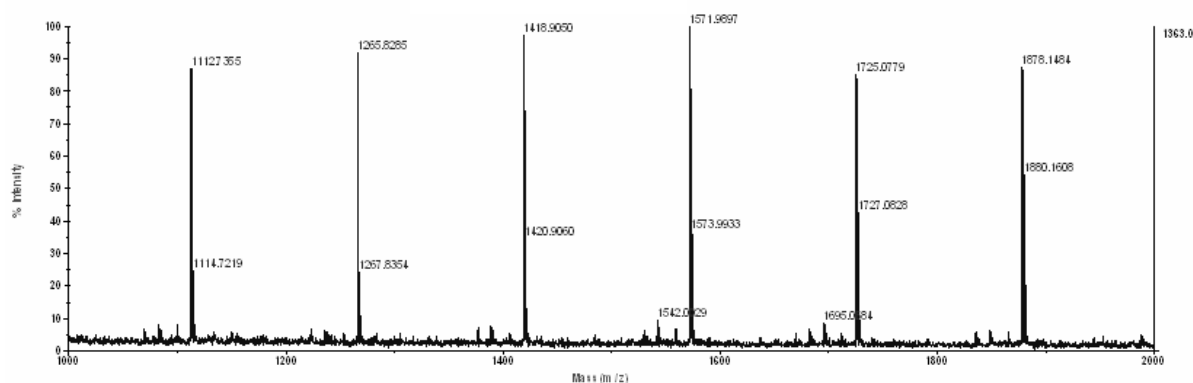


Abbildung 36 - MS Spektrum des Indermil™-Polymers (Ausschnitt)

Beim Sicomet®-Polymer finden sich ausgeprägte Signale der (M-30) und (M+30) Polymererien, wohingegen beim Indermil™-Polymer fast ausschließlich die Peaks des erwarteten Polymers zu erkennen sind. Da das Indermil™-Polymer unter neutralen Bedingungen polymerisiert wird, findet keine saure- oder basische Katalyse der (Retro)-Aldol-Addition statt; es entstehen keine Derivate des PBCAs. Eventuell verhindert auch der im Indermil™ zusätzlich enthaltene, organische Stabilisator eine Bildung der Derivate.

4.4.2.3 Einbindung des Stabilisators und des Arzneistoffs in die Polymerstruktur.

PBCA-NP sind als Arzneistoffträger für die verschiedensten Arzneistoffe vorgeschlagen worden. In der Literatur finden sich Theorien, dass der Arzneistoff (z.B. Doxorubicin) (Vansnick 1984; Soma 2000) oder der Stabilisator (z.B. Dextran 70.000) (Douglas 1985) während der Polymerisationsreaktion kovalent an das Polymer der Partikel gebunden wird. Diese kovalente Bindung des Arzneistoffs an die Polymermatrix und somit an die Nanopartikel würde zwar eine hohe Arzneistoffbeladung zur Folge haben, hätte jedoch große Nachteile im Bezug auf die Arzneistofffreisetzung. Es ist davon auszugehen, dass kovalent gebundener Arzneistoff keine schnelle Freisetzung in vivo ermöglicht.

Unter diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit Doxorubicin-beladene PBCA-Partikel mit Hilfe von MALDI-TOF MS näher untersucht. Das Massenspektrum dieser NP ist phänotypisch identisch mit dem Spektrum unbeladener Partikel. Im Massenspektrum der beladenen NP findet sich kein Hinweis auf eine kovalente Bindung des Arzneistoffs an die Polymerketten, was durch zusätzliche, um das Molekulargewicht von Doxorubicin (580 g/mol) verschobene Peaks, zu erkennen wäre. Daher ist davon auszugehen, dass der Arzneistoff ausschließlich durch Adsorption oder Inkorporation gebunden ist. Auch Konjugate aus Stabilisator und Polymer konnten mittels MS nicht detektiert werden. Weder Arzneistoff noch Stabilisator scheinen kovalent gebunden vorzuliegen.

4.4.3 Kopplung SEC – MALDI-TOF MS

Die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts von chemisch einheitlichen Proben mit einer engen Molekulargewichtsverteilung, lässt sich relativ problemlos mittels MALDI-TOF MS durchführen. Allerdings neigt die MS bei breiter verteilten Proben dazu, die kleineren Massen zu stark zu gewichten, was zu falsch niedrigen mittleren Molekulargewichten führen kann. Um diese Schwäche der MS auszugleichen, wurde vorgeschlagen die breit verteilte Probe zunächst mittels GPC zu fraktionieren und die enger verteilten Fraktionen separat massenspektrometrisch zu vermessen (Lou 2000; Nonier 2004). Für jede einzelne Fraktion kann im Anschluss das mittlere

Molekulargewicht (M_n und M_w) und die Polydispersität errechnet werden. Die Gesamtverteilung der unfractionierten Probe lässt sich mit Hilfe der unter 3.2.13 eingeführten Formeln berechnen. Da es sich bei dem Produkt der Emulsionspolymerisation von BCA ebenfalls um ein Polymer mit relativ breiter Molekulargewichtsverteilung handelt, wurde die Kopplung von GPC und MALDI-TOF MS untersucht. Die Abbildung 37 zeigt die Einteilung der Fraktionen:

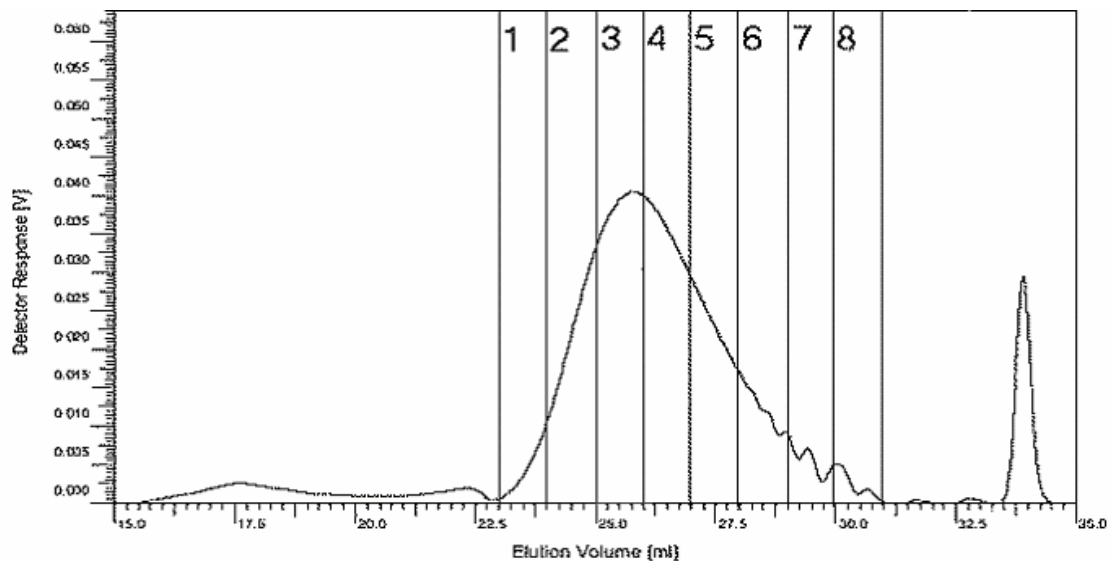


Abbildung 37 - Elugramm der PBCA-Probe / Einteilung der verwendeten Fraktionen

Die mittels MALDI ermittelten Molekulargewichte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Für die erste Fraktion wurde kein auswertbares Massenspektrum erhalten.

Tabelle 12 - Mittlere Molekulargewichte der unfractionierten Probe, der Polymerfraktionen und nach off-line Kopplung von MALDI-GPC, bestimmt mittels MALDI-TOF MS

Fraktion	M _n [Da]	M _w [Da]	PD
unfraktioniert	2723	3534	1,30
1	-	-	-
2	3198	4326	1,35
3	3014	3901	1,29
4	2251	2932	1,30
5	1960	2336	1,19
6	1554	1713	1,10
7	1110	1245	1,12
rekombiniert	2294	3179	1,39

Im Gegensatz zu unseren Erwartungen führte die Fraktionierung mit Hilfe der GPC nicht generell zu einer verringerten Polydispersität der einzelnen Fraktionen. Die Polydispersität der Fraktionen 3 und 4 blieb unverändert, stieg für Fraktion 2 an und nahm für Fraktion 5 - 7 ab.

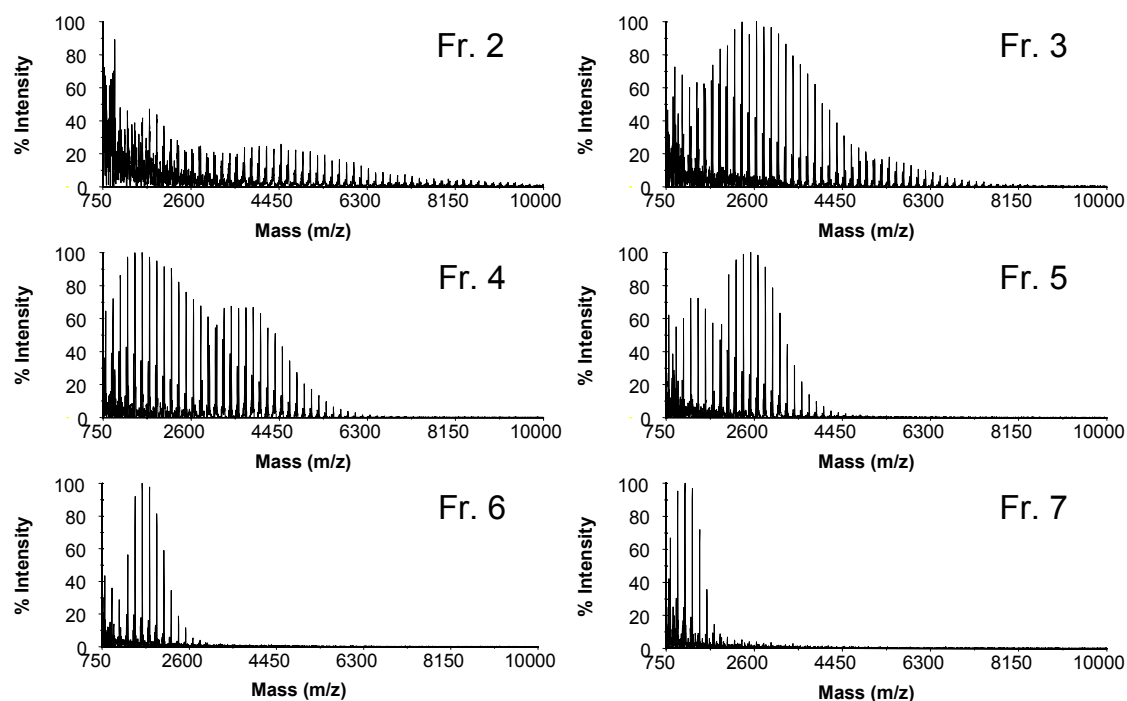


Abbildung 38 - Massenspektren der Fraktionen nach Auftrennung mittels GPC (Reflektormodus)

Bei näherer Betrachtung der Massenspektren der einzelnen Fraktionen (Abb. 38) fällt auf, dass sich in der fraktionierten Probe drei unterschiedliche Polymerserien befinden, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen auch unterschiedlich schnell eluiert werden. Bei gleicher Anzahl an Monomereinheiten zeigen die Oligomere der (M-30)-Polymerreihe deutlich weniger Interaktion mit der Säule und werden schneller eluiert als die Oligomere der (M+30)-Serie, welche eine deutlich stärkere Retention zeigen und später eluiert werden. Berücksichtigt man, dass es sich bei dem verwendeten Säulenmaterial um eine recht hydrophile Substanz handelt, so entspricht die Elutionsreihenfolge sehr gut den zu erwartenden Änderungen in Polarität und Hydrophilität, welche durch die Abspaltung bzw. die Addition von Formaldehyd entstehen.

Im Allgemeinen erscheint die Kombination aus GPC und MALDI bei unbekannten Polymeren, für die kein adäquater GPC Kalibrierstandard verfügbar ist und welche aufgrund ihrer hohen Polydispersität nicht durch ein einziges MALDI-Spektrum abgebildet werden können, als sinnvoll (Lou 2000; Nonier 2004). Zum einen kann die MALDI-TOF MS genutzt werden, um eine absolute Kalibrierung für die GPC durchzuführen, zum anderen kann die GPC – wie in diesem Fall – als Probenvorbereitung für die MS genutzt werden.

Im vorliegenden Fall führte die chromatographische Fraktionierung der Proben und anschließende Analyse mittels MALDI allerdings nicht zu einer generellen Verbesserung gegenüber der MALDI-Messung der unfraktionierten Probe. Im Falle des untersuchten PBCA führte die Anwesenheit von drei unterschiedlichen Polymerreihen zu einer kompletten Frustration der chromatographischen Auftrennung.

4.4.4 Vergleichende Bewertung GPC und MALDI-TOF MS

Die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts mit Hilfe der GPC und der MALDI-TOF MS führt bei unserem Polymer zu einem unterschiedlichen Ergebnis für M_w und PD, was eine nähere Betrachtung des Ausmaßes und eine Diskussion der möglichen Gründe notwendig erscheinen lässt.

Für die Bestimmung des zahlenmittleren Molekulargewichts (M_n) liefern beide Verfahren nahezu identische Ergebnisse mit einem Unterschied, der im Bereich der typischen Standardabweichung beider Verfahren von 5 % liegt. Dies lässt vermuten, dass beide Verfahren in diesem Punkt hinreichend genau und gleich gut geeignet sind.

Im Gegensatz hierzu liefert die Bestimmung des gewichtsmittleren Molekulargewichts (M_w) bei der MALDI deutlich geringere Werte als die GPC, was auch zu einem großen Unterschied in den Werten der Polydispersität ($PD = M_w/M_n$) führt.

Diese Unterschiede lassen sich durch die Vor- und Nachteile erklären, welche beiden Verfahren anhaften.

Durch das rein chromatographische Prinzip der GPC wird bei der Auftrennung weder die chemische Zusammensetzung noch die Gesamtverteilung der Probe verändert. Setzt man eine Linearität des verwendeten Detektors voraus, so spiegelt das Elugramm ein wahres Abbild aller vorhandenen Komponenten der Probe wieder. Ein weiterer Vorteil ist die Einfachheit der Methode, da man lediglich eine spezielle Größenausschlußsäule für eine bereits vorhandene HPLC-Anlage benötigt, um diese in eine GPC umzuwandeln.

Allerdings weist dieses chromatographische Verfahren auch zwei wesentliche Nachteile auf: Als erstes ist anzuführen, dass zwischen der Retentionszeit der Substanz und seinem Molekulargewicht keine direkte Beziehung besteht. Um von der Retentionszeit auf das Molekulargewicht schließen zu können, benötigt man eine Kalibrierung des Systems mit einem chemisch identischen Standard. Ist kein identischer Standard verfügbar, oder handelt es sich um eine inhomogene Probe

(z.B. Polymerketten mit unterschiedlichen Endgruppen), so kann die Umwandlung des Elugramms in eine Molekulargewichtsverteilung zu gravierenden systematischen Fehlern führen, da nicht auszuschließen ist, dass die Auftrennung der Probe nicht nur auf Basis der Größe, sondern auch auf Grundlage der Hydrophilie bzw. Lipophilie der Probe geschieht. Diese Problematik wird durch das von uns beobachtete Retentionsverhalten der unterschiedlichen Polymerserien bei der GPC-MALDI Kopplung deutlich: Polymerketten mit fast identischem Molekulargewicht (Unterschied ± 30 Da) zeigen ein deutlich versetztes Elutionsverhalten. Als zweiter Nachteil ist die relativ geringe Auflösung der GPC anzuführen, welche die Anwendung dieser Methode auf die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts und der Polydispersität der Probe beschränkt.

Aufgrund der hohen Auflösung und Genauigkeit über einen breiten Massenbereich, liegt der Anwendungsschwerpunkt der MALDI-TOF MS in der Analytik synthetischer Polymere. Mit diesem Verfahren ist es möglich die exakte Masse jedes einzelnen Oligomers zu erfassen und das gewichts- und zahlenmittlere Molekulargewicht zu bestimmen. Hierdurch wird es möglich auch Rückschlüsse auf die chemische Struktur der Moleküle zu ziehen (Pasch 1995). Allerdings kommt es bei der MALDI durch Faktoren wie z.B. verringerter Transmissionseffizienz und Detektorempfindlichkeit insbesondere bei größeren Massen zu einer verminderten Empfindlichkeit, einem schlechteren Signal/Rausch-Verhältnis und infolge dessen zu einer Unterrepräsentation höherer Massen. Dieses „Abschneiden“ höherer Massen hat nur einen geringen Einfluss auf das zahlenmittlere Molekulargewicht (M_n), da M_n durch die Gesamtzahl der bestimmten Moleküle bestimmt wird, wohingegen das gewichtsmittlere Molekulargewicht (M_w) auf die Gesamtmasse der bestimmten Moleküle bezogen ist. Solange das Massenspektrum den Großteil der vorhandenen Moleküle erfasst, und die Anzahl der nicht erfassten, schwereren Moleküle klein ist, ist der Einfluss auf das zahlenmittlere Molekulargewicht gering. Allerdings kann es zu größeren Fehlern im gewichtsmittleren Molekulargewicht kommen, wenn der Gewichtsanteil der nicht detektierten Moleküle groß ist.

Abschließend lässt sich festhalten, dass beide Methoden ihre speziellen Vorteile haben: Bei der GPC handelt es sich um eine einfache und vergleichsweise

preisgünstige Methode, um die Massenverteilung auch breit verteilter Proben mit bekannter chemischer Struktur zu detektieren. MALDI-TOF MS hat ihre Stärken eher in der strukturellen Untersuchung unbekannter Polymere.

Das zahlenmittlere Molekulargewicht kann mit beiden Methoden hinreichend genau bestimmt werden, wohingegen die Bestimmung des gewichtsmittleren Molekulargewichtes und der Polydispersität den Einsatz der GPC erfordert. Neben diesen Schwächen in der Quantifizierung besitzt MALDI große Vorteile in der Strukturaufklärung der untersuchten Polymere.

Sieht man von den relativ hohen Anschaffungskosten ab, erscheint die MALDI-TOF MS die potentere Methode zur Charakterisierung der PBCA-NP zu sein.

4.5 Einfluss der Herstellungsparameter auf die Herstellung von Nanopartikeln durch Emulsionspolymerisation

4.5.1 Einfluss des Herstellungsvolumens

Gewöhnlich erfolgt die Herstellung der PBCA-Nanopartikel in einem Volumen zwischen 20 und 50 ml. Dieses Volumen ist ausreichend groß um befriedigende Partikel ausbeuten zu erzielen und lässt sich problemlos mittels Magnetrührer durchmischen.

Um den Einfluss des Herstellungsvolumens näher zu beleuchten, wurden Dextran-stabilisierte Partikel mit kleinerem Volumen (1 ml) und deutlich größerem Volumen (1 l) hergestellt. Beide Zubereitungen wurden – analog zur üblichen Herstellung – mittels Magnetrührer gerührt. Die Herstellung des 1 Liter-Ansatzes erfolgte zudem unter Sterilbedingungen. Die Herstellung größerer Volumina sollte im Hinblick auf ein Scaling-Up für eine klinische Studie und eine spätere industrielle Herstellung geprüft werden.

Tabelle 13 - Einfluss des Herstellungsvolumens auf Partikeldurchmesser, PD und Ausbeute (n = 3)

	Ø [nm]	PD	Ausbeute [%]
1 ml Ansatz	187,3 ± 12,3	0,399 ± 0,077	73,1 ± 17,0
20 ml Ansatz	192,7 ± 2,1	0,285 ± 0,022	90,0 ± 6,2
1 l Ansatz	217,1 ± 2,0	0,298 ± 0,056	77,4 ± 7,7

Zu erkennen ist, dass alle drei verglichenen Ansätze zu Nanopartikeln im Größenbereich von 180 – 220 nm führen und eine Polydispersität < 0,4 aufweisen. Die vermeintlichen Unterschiede besitzen mit Ausnahme der größeren Partikel beim 1 l Ansatz keine statistische Signifikanz. Der Trend einer höheren Polydispersität und einer geringeren Polymerausbeute beim 1 ml Ansatz lässt sich durch eine schlechtere Durchmischung und Kontrolle der Polymerisationsreaktion bei kleinen Volumina begründen. Es konnte gezeigt werden, dass NP auf Basis von PBCA problemlos im Volumenbereich von 1 ml – 1 l hergestellt werden können.

4.5.2 Einfluss der Polymerisationszeit

Ein Blick in die Literatur zu Polyalkylcyanoacrylaten fördert die unterschiedlichsten Angaben über die Polymerisationszeit zu Tage. Die für die Herstellung der NP benötigte Zeit differiert zwischen 2 h und 24 h (Reddy 2004a). Die nachfolgende Tabelle gibt die Eigenschaften Partikeldurchmesser, Polydispersität und Partikelausbeute von Pluronic® F68- und Dextran-stabilisierten Partikel in Abhängigkeit von der Zeit wieder.

Tabelle 14 - Unterschiede in Partikeldurchmesser, Polydispersität und Partikelausbeute in Abhängigkeit von der Polymerisationszeit (n = 1)

	Pluronic® F68-stabilisiert			Dextran-stabilisiert		
	Ø [nm]	PD	Ausbeute [%]	Ø [nm]	PD	Ausbeute [%]
2,5 h	208,5	0,016	56	178,6	0,229	60
4 h	209,8	0,024	61	187,8	0,280	59
48 h	213,1	0,006	-	188,5	0,265	-
120 h	210,7	0,006	59	192,5	0,258	67

Bereits nach 2,5 – 4 h scheint die Bildung der NP weitgehend abgeschlossen. Es ist keine weitere Zunahme der NP-Größe oder der Ausbeute zu erkennen. Die Unterschiede zwischen den beiden frühen und den späteren Zeitpunkten liegen im Bereich der Standardabweichungen der verwendeten Messverfahren. Der verwendete Stabilisator scheint keinen Einfluss auf die benötigte Polymerisationszeit zu haben. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von N. Behan, der den Einfluss der Polymerisationszeit auf die NP anhand der Partikelgröße, der Partikelausbeute und des Molekulargewichtsprofils untersucht hat (Behan 2001).

Die hier dargestellten Daten wurden mit Sicomet® 6000 als Monomer gewonnen. Zu beachten ist, dass sich auch chemisch identische Monomere je nach Marke stark in ihrem Polymerisationsverhalten unterscheiden können, da sie unterschiedliche Stabilisatoren und Stabilisatorkonzentrationen enthalten. Als Beispiel hierfür sei das unterschiedliche Verhalten von Sicomet® und Indermil™ genannt (vgl. auch 4.4.2.2).

Selbst bei Verwendung von Monomeren des selben Herstellers können Unterschiede zwischen einzelnen Produktionschargen auftreten, was unter anderem durch thermische Untersuchungen gezeigt werden konnte (Behan 2001).

4.5.3 Einfluss des Neutralisationsverfahrens

Die Neutralisation der hergestellten Nanopartikel erfolgte bisher durch Zugabe von verdünnter Natronlauge zum Reaktionsgemisch und Kontrolle des resultierenden pH-Werts. Zur Vereinfachung dieses Arbeitsschritts sollte ein konzentrierter Phosphat-Puffer zur Neutralisation verwendet werden. Durch Verwendung eines Phosphatpuffers würde das „Titrieren“ des Neutralpunkts entfallen, was insbesondere im Hinblick auf eine Herstellung unter der Sicherheitswerkbank bzw. der Herstellung in der Industrie von großem Vorteil wäre. In diesem Abschnitt werden die physikochemischen Unterschiede der NP, welche durch Natronlauge bzw. durch Puffer neutralisiert wurden, dargestellt.

Tabelle 15 - Unterschiede in Partikeldurchmesser, Polydispersität und Partikelausbeute in Abhängigkeit des Neutralisationsverfahrens (n = 3)

	Pluronic® F68-stabilisiert			Dextran-stabilisiert		
	Ø [nm]	PD	Ausbeute [%]	Ø [nm]	PD	Ausbeute [%]
Natronlauge	250,4 ± 0,7	0,032 ± 0,011	79 ± 9	192,7 ± 2,1	0,285 ± 0,021	90 ± 6
Phosphatpuffer	252,2 ± 3,6	0,049 ± 0,031	71 ± 3	187,1 ± 3,0	0,281 ± 0,046	89 ± 6

Es konnte gezeigt werden, dass bei keinem detektierten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Partikeln, welche auf unterschiedlichem Wege neutralisiert wurden, besteht. Die Neutralisation nicht-beladener NP kann ohne Bedenken auch mit einem konzentrierten Phosphatpuffer durchgeführt werden.

Die Neutralisation von Doxorubicin-beladenen NP mit Phosphat-Puffer sollte jedoch unterbleiben, da es hier zu einem Verklumpen der NP-Suspension kommt. Wahrscheinlich führt die Zugabe der negativ geladenen Phosphat-Ionen zu einem Ladungsausgleich der positiv geladenen DOX-NP (vgl. auch 4.7.2, Zetapotential DOX-beladener NP).

4.6 Einfluss der Herstellungsparameter auf Doxorubicin-beladene Nanopartikel

Die bisherigen Publikationen über Doxorubicin-beladene PBCA-NP setzen Doxorubicin meist in einem Arzneistoff-Polymer-Verhältnis von 1:4 ein und verwenden Dextran 70.000 als Stabilisator für die NP-Suspension (Gelperina 2000; Steiniger 2004). Das Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, welchen Einfluss ein alternativer Stabilisator auf die Partikeleigenschaften Partikelgröße, Polydispersität, Partikelausbeute und Arzneistoffbeladung ausübt. Zusätzlich sollte betrachtet werden, ob durch Verringerung des Arzneistoff-Polymer-Verhältnisses die prozentuale Arzneistoffbeladung erhöht werden kann.

Da sich das Tensid Pluronic® F68 bei den bisherigen Versuchen als sehr viel versprechend erwiesen hat, wurden im Folgenden Partikel mit F68 als Stabilisator hergestellt und ihre Eigenschaften mit Dextran-stabilisierten PBCA-NP verglichen.

4.6.1 Partikelgröße

Die nachfolgende Grafik gibt den mittleren Partikeldurchmesser aller hergestellten NP-Zubereitungen wieder. Bereits auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass es sich durchweg um Partikel mit sehr einheitlicher Größe handelt. Der mittlere Partikeldurchmesser aller Zubereitungen beträgt 205 ± 3 nm.

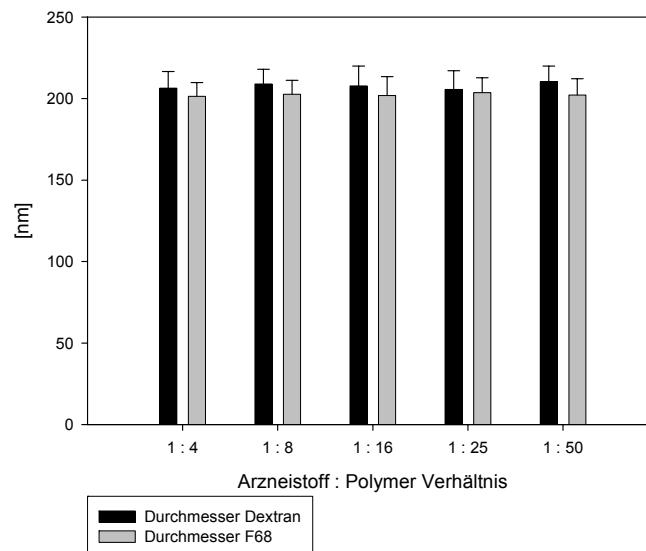


Abbildung 39 - mittlerer Partikeldurchmesser bei versch. Arzneistoff : Polymer Verhältnissen - Stabilisator: Dextran bzw. Pluronic® F68 (n = 3)

Die Pluronic-stabilisierten Partikel scheinen einen etwas kleineren Durchmesser zu besitzen, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Das Verhältnis zwischen Arzneistoff und Polymer hat keinen Einfluss auf die Partikelgröße.

4.6.2 Polydispersität

Deutlich größere Unterschiede gibt es bei der Polydispersität der hergestellten NP. Zubereitungen, welche Pluronic als Stabilisator enthalten, besitzen eine signifikant engere Größenverteilung (PD $0,015 \pm 0,004$), als Dextran-Zubereitungen (PD $0,352 \pm 0,009$). Das Arzneistoff-Polymer-Verhältnis scheint hier, wie bereits beim mittleren Partikeldurchmesser, keinen Einfluss zu besitzen.

Die enge Größenverteilung der F68-stabilisierten Partikel deckt sich mit den Ergebnissen aus DLS, AUZ, REM und RKM für leere Partikel (siehe 4.3).

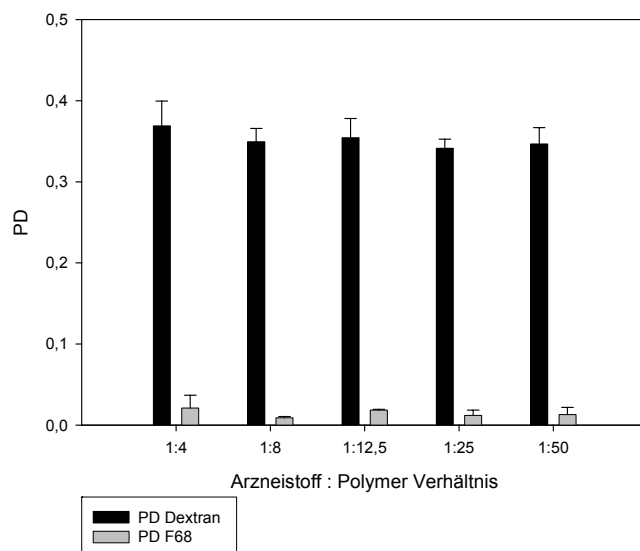


Abbildung 40 – Polydispersität der Partikelgröße bei versch. Arzneistoff-Polymer-Verhältnissen - Stabilisator: Dextran bzw. Pluronic® F68 (n = 3)

4.6.3 Partikelausbeute

Die Partikelausbeute gibt an, wie viel Prozent an eingesetztem Monomer nach der Polymerisation in Form von Nanopartikeln angefallen ist. Die durchschnittliche Ausbeute - bei Betrachtung aller Zubereitungen - beträgt $86 \pm 8 \%$. Die augenscheinlichen Unterschiede in den Mittelwerten besitzen aufgrund der relativ großen Standardabweichung keine Signifikanz. Es soll kritisch angemerkt werden, dass die Partikelausbeuten der beladenen NP unerwartet hoch ausgefallen sind. Ein systemischer Fehler bei der gaschromatographischen Bestimmung kann nicht ausgeschlossen werden. Da sich ein solcher Fehler nur auf die absoluten Werte auswirken würde, wäre die Vergleichbarkeit der verschiedenen Zubereitungen untereinander jedoch weiterhin gegeben.

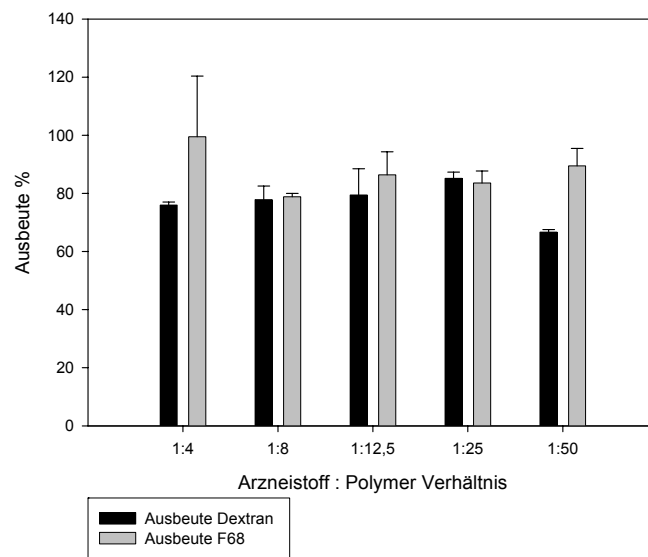


Abbildung 41 – Partikel ausbeute in % bei versch. Arzneistoff-Polymer-Verhältnissen - Stabilisator: Dextran bzw. Pluronic® F68 (n = 3)

4.6.4 Arzneistoffbeladung

Bei der Arzneistoffbeladung zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Stabilisatoren: Dextran-DOX-PBCA-NP weisen eine einheitliche Arzneistoffbeladung von 69 ± 2 % auf, wohingegen die Beladung der Pluronic-stabilisierten Partikel vom Arzneistoff-Polymer-Verhältnis abhängig zu sein scheint. Hier kann mit sinkender Arzneistoffkonzentration prozentual mehr Arzneistoff gebunden werden.

Die konstante Beladungsrate bei den Dextran-NP könnte ein Hinweis darauf sein, dass das vorliegende System noch nicht gesättigt ist. Es ist zu vermuten, dass bei Arzneistoff-Polymer-Verhältnissen von 1:2 und 1:1 eine Sättigung und folglich eine geringere prozentuale Arzneistoffbeladung resultieren würde. Diese Versuche wurden aufgrund der großen Menge an benötigtem Doxorubicin nicht durchgeführt.

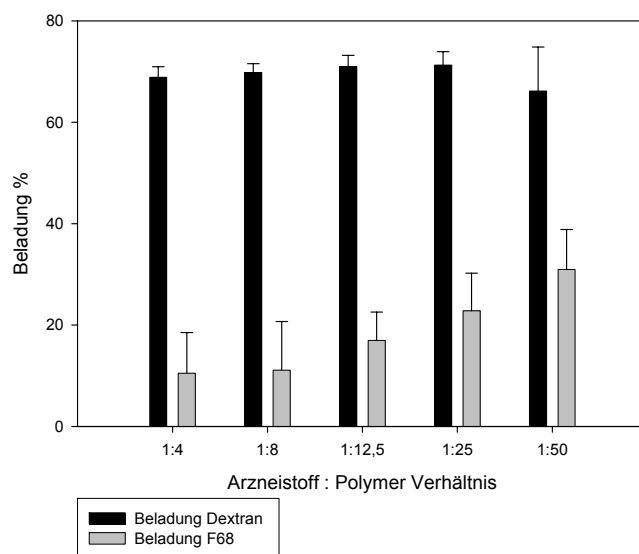


Abbildung 42 – Arzneistoffbeladung in % bei versch. Arzneistoff-Polymer-Verhältnissen - Stabilisator: Dextran bzw. Pluronic® F68 (n = 3)

4.6.5 Abschließende Bewertung

Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der Herstellung von Doxorubicin-beladenen NP um einen gut reproduzierbaren Prozess handelt. Die Art des verwendeten Stabilisators und das Arzneistoff-Polymer-Verhältnis scheint keinen Einfluss auf die Partikelgröße und die Partikelausbeute zu haben. Das Verhältnis zwischen Doxorubicin und PBCA hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Polydispersität der Größenverteilung.

Allerdings scheint der verwendete Stabilisator einen wichtigen Einfluss auf die Arzneistoffbeladung zu haben, welche im Hinblick auf eine Anwendung der Formulierung am Tier oder Menschen als sehr wichtig erscheint. Unter den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten DOX-NP zeigten Dextran-stabilisierte Zubereitungen stets die beste prozentuale Beladung.

4.7 Zetapotential

4.7.1 Zetapotential leerer Partikel

Im folgenden Versuch wurde das Zetapotential von durch Emulsionspolymerisation hergestellten PBCA-NP näher untersucht. Der Einfluss des Coatings auf die Oberflächenladung wurde ebenfalls näher betrachtet.

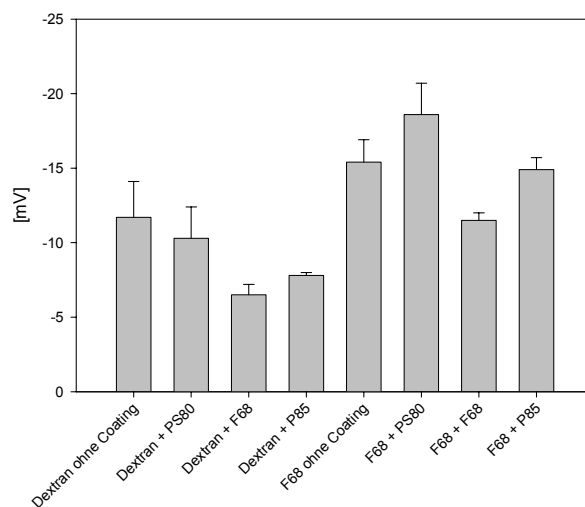


Abbildung 43 - Zetapotential leerer PBCA-NP ohne/mit Coating in Phosphat-Puffer

Nicht überzogene Dextran-stabilisierte NP zeigen ein Zetapotential von $-11,7 \pm 2,4$ mV, wohingegen Pluronic® F68-stabilisierte Partikel ein statistisch signifikant negativeres Potential von $-15,4 \pm 1,5$ mV besitzen. Betrachten man nur die Dextran-stabilisierten NP, so scheint der Zusatz von Tensiden das Zetapotential zu verringern. Bei den F68-stabilisierten NP ist dieses Phänomen weniger stark ausgeprägt.

Es ist denkbar, dass die zusätzliche Tensidschicht das Oberflächenpotential nach außen hin abschirmt und so zu einem geringeren Wert für das Zetapotential führt. Da es sich bei den verwendeten Tensiden um nicht-ionische und ungeladene Moleküle handelt, ist ein Effekt wie er bei kationischen Tensiden zu beobachten wäre, auszuschließen. Hier würden die positiv geladenen Tensidmoleküle zu einem

Ladungsausgleich der negativ geladenen NP führen (siehe auch 4.7.2 Zetapotential Doxorubicin-beladener Partikel).

4.7.2 Zetapotential Doxorubicin-beladener Partikel

Da das Zetapotential einer NP-Suspension stark von der Konzentration der Nanopartikel, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Mediums abhängig ist, wurden alle Bestimmungen standardmäßig bei gleicher Konzentration in einem verdünnten Phosphatpuffer durchgeführt.

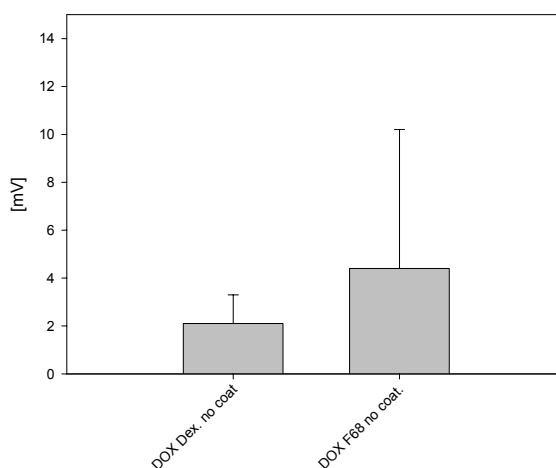


Abbildung 44 - Zetapotential DOX-beladener NP in Phosphat-Puffer

Allerdings führt die Bestimmung des Zetapotentials Doxorubicin-beladener Partikel zu Ergebnissen mit großer Standardabweichung (relative Standardabweichung $> 100\%$). Dies lässt sich durch eine Wechselwirkung des kationischen Doxorubicins mit den anionischen Phosphationen des verwendeten Puffers erklären. Durch die Phosphationen wird das stark positive Oberflächenpotential der Nanopartikel teilweise kompensiert.

Um diese Verfälschung zu eliminieren wurden die weiteren Bestimmungen der arzneistoffbeladenen NP in Abweichung vom Standardprotokoll in Milli-Q-Wasser durchgeführt.

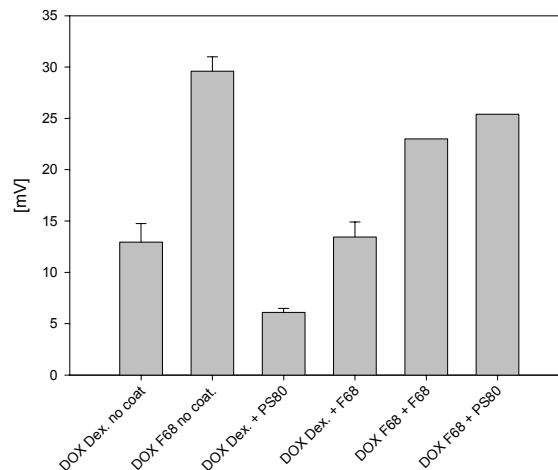


Abbildung 45 - Zetapotential Doxorubicin-beladener NP in Wasser, ohne/mit Coating

Im Vergleich zur Messung in Phosphatpuffer zeigen die beladenen Partikel in reinem Wasser ein deutlich höheres Zetapotential. An der kleineren Standardabweichung (relative Standardabweichung < 15%) ist zu erkennen, dass die Reproduzierbarkeit der Messung in Wasser deutlich verbessert ist.

Analog zu den leeren PBCA-NP ist das Potential der F68-stabilisierten Zubereitungen signifikant negativer, als das der Dextran-stabilisierten Partikel. Auffällig ist, dass auch hier wie bei den unbeladenen NP das Zetapotential der geccoateten Partikel abgeschwächt wird. Eventuell kommt es wie bei den unbeladenen NP durch die zusätzliche Tensidhülle zu einer Abschirmung der Partikelladung.

4.8 Einfluss alternativer Herstellungsverfahren auf die Eigenschaften von PBCA-Nanopartikel

Alle in der Zellkultur und im Tierversuch getesteten PBCA-Nanopartikel sind auf dem Wege der anionischen Emulsionspolymerisation erhalten worden⁴. Neben der Emulsionspolymerisation lassen sich auch die Grenzflächenpolymerisation, die radikalische Emulsionspolymerisation und die Nanopräzipitation zur Herstellung von kleinpartikulären Arzneiformen auf Basis von Cyanoacrylaten einsetzen.

In diesem Teil der Arbeit wurden Partikel durch Nanopräzipitation hergestellt und charakterisiert. Die erhaltenen Kennzahlen wurden mit den Werten der durch Emulsionspolymerisation hergestellten Partikel verglichen. Zusätzlich wurde Pluronic® P85 als Stabilisator eingeführt. Eine Verwendung dieses Stabilisators erscheint hilfreich, da P85 als starker Pgp-Inhibitor bekannt ist (Batrakova 2001b; Kabanov 2003). Es soll geprüft werden, ob mit seiner Hilfe einheitliche Partikel hergestellt werden können, welche zugleich eine hemmende Wirkung auf den Efflux-Transporter ausüben.

⁴ mit Ausnahme der Nile Red-NP

4.8.1 Partikelgröße

Die nachfolgende Abbildung stellt den mittleren Partikeldurchmesser in Abhängigkeit des verwendeten Stabilisators und Herstellungsverfahrens dar. Die Partikel besitzen eine Größe zwischen 130 und 250 nm.

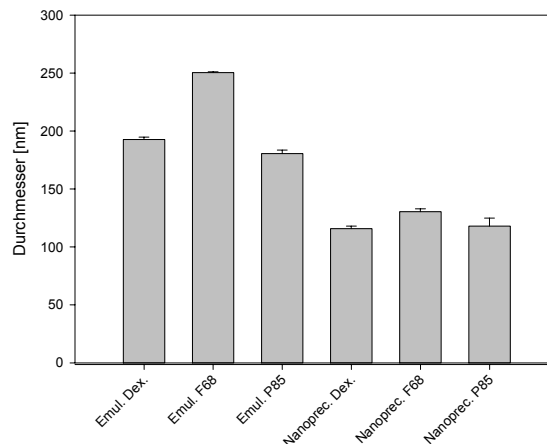


Abbildung 46 – Einfluss des Herstellungsverfahrens auf den Partikeldurchmesser (n = 3)

Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied im Partikeldurchmesser zwischen den verschiedenen Herstellungsmethoden ($P < 0,010$). Bei der Emulsionspolymerisation scheint auch der Stabilisator einen wichtigen Einfluss auf die Größe der resultierenden NP zu besitzen. Die relative Standardabweichung liegt bei allen Zubereitungen, mit Ausnahme der Pluronic® P85-Nanopräzipitation, unter 2%, was auf ein gut reproduzierbares Verfahren schließen lässt.

4.8.2 Polydispersität

Die Polydispersität ist ein Maß für die Streuung der Größenverteilung. Es ist offensichtlich, dass die F68-stabilisierten Partikel, welche durch Emulsionspolymerisation hergestellt wurden, die engste Größenverteilung besitzen ($PD\ 0,0320 \pm 0,0107$). Alle anderen Zubereitungen zeigen deutlich breitere Verteilungen mit $PD > 0,170$. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zu den übrigen Zubereitungen ($P < 0,010$).

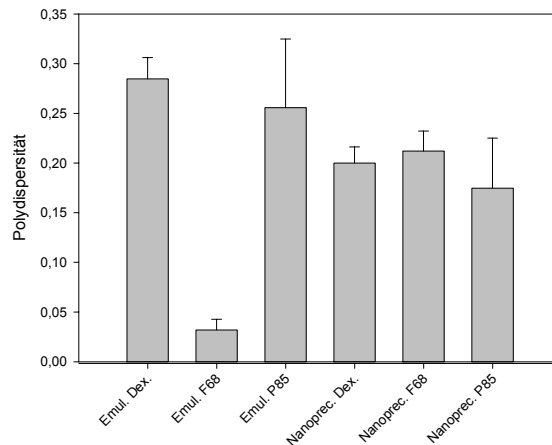


Abbildung 47 - Einfluss des Herstellungsverfahrens auf die Partikelgrößenverteilung (n = 3)

4.8.3 Partikelausbeute

Die Partikelausbeute gibt an, wie viel Prozent an eingesetztem Monomer nach der Polymerisation in Form von Nanopartikeln vorliegt. Die Partikelausbeute der durch Nanopräzipitation hergestellten Partikel wurde nicht bestimmt. Da nach Verdampfen des Lösungsmittels das gesamte ehemals gelöste Polymer in Form von Nanopartikeln ausfällt, liegt die Ausbeute dieser Herstellungsmethode (theoretisch) bei 100 %.

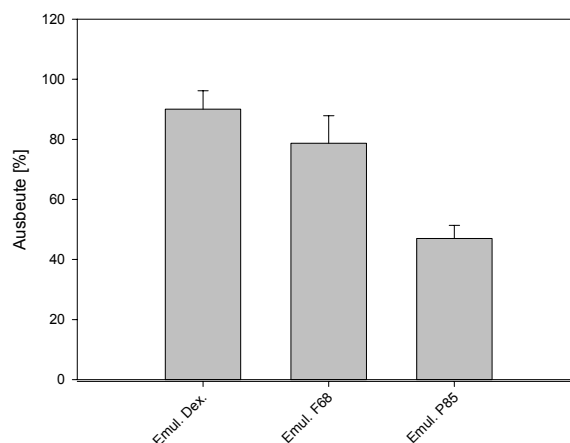


Abbildung 48 - Einfluss des Stabilisators der Emulsionspolymerisation auf die Partikelausbeute (n = 3)

Partikel welche mit Pluronic® P85 hergestellt werden, haben die geringste Partikelausbeute. Es gibt einen statistisch signifikanten Unterschied zu den beiden anderen Verfahren ($P < 0,005$). Im Vergleich zwischen Dextran 70.000 (Ausbeute $90 \pm 6 \%$) und Pluronic® F68 ($70 \pm 9 \%$) erscheint Dextran leicht höhere Partikelausbeuten zu liefern.

4.8.4 Abschließender Vergleich der verschiedenen Herstellungsverfahren

Es konnte gezeigt werden, dass die Möglichkeit besteht PBCA-NP nicht nur durch Emulsionspolymerisation, sondern auch durch Nanopräzipitation des Polymers herzustellen. Die erzeugten Partikel besitzen dabei eine akzeptable Partikelgröße und eine vertretbare Polydispersität.

Der verwendete Stabilisator scheint bei der Emulsionspolymerisation einen stärkeren Einfluss auszuüben als bei der Nanopräzipitation. Insbesondere Partikelgröße und Polydispersität als auch die Partikelausbeute sind bei der Emulsionspolymerisation vom verwendeten Stabilisator abhängig.

Dextran 70.000 und Pluronic® F68 scheinen für die Emulsionspolymerisation und für die Nanopräzipitation geeignet. Die Verwendung von Pluronic®P85 als Stabilisator der Polymerisation ist zwar möglich, führt aber zu deutlich geringeren Partikelausbeuten, weshalb dieser Hilfsstoff nur bei der Herstellung durch Präzipitation verwendet werden sollte.

4.8.5 Doxorubicin-beladene PBCA-NP durch Nanopräzipitation

Es soll erwähnt werden, dass versucht wurde, Doxorubicin-beladene NP mittels Nanopräzipitation herzustellen. Die Verkapselung des Arzneistoffs erfolgte in Anlehnung an eine Arbeit der Arbeitsgruppe Couvreur durch zwei unterschiedliche Methoden (Brigger 2004): (i) Doxorubicin-HCl wurde in einer Konzentration von 2,5 mg/ml zusammen mit 1% (m/V) Pluronic® F68 in der wässrigen Phase gelöst. Diese Lösung wurde unter Rühren zu einer Lösung von 10 mg/ml PBCA in Aceton gegeben. (ii) Doxorubicin-HCl wurde mit Hilfe von Triethylamin (TEA) in die freie

Base überführt und zusammen mit dem Polymer in Aceton gelöst. Sodann wurde zu dieser Lösung die wässrige Tensidlösung gegeben.

Auf beiden Herstellungswegen konnte keine stabile NP-Suspension erhalten werden. Es kam zur Agglomeratbildung und Sedimentation der aggregierten Partikel. Mögliche Ursachen sind die chemische Natur und Konzentration des verwendeten Polymers und die hohe Doxorubicin-Konzentration.

4.8.6 Leere PBCA-NP durch radikalische Polymerisation

Als weitere Alternative zur Emulsionspolymerisation und Nanopräzipitation können PBCA-NP durch radikalische Polymerisation des Monomers gebildet werden. Die auf diesem Wege erhaltenen PBCA-NP besaßen eine Größe von $171,4 \pm 26$ nm und eine Polydispersität von $0,241 \pm 0,030$. Somit sind sie in ihrer Größe und der Breite der Größenverteilung mit Partikeln, welche auf dem Wege der Emulsionspolymerisation erhalten wurden, durchaus vergleichbar.

Allerdings besitzt dieses Verfahren zwei gravierende Nachteile: Zum einen ist die schnell verlaufende, radikalische Reaktion deutlich schwieriger zu kontrollieren, was auch an der großen Standardabweichung des mittleren Partikeldurchmessers zu erkennen ist. Und zum anderen enthält die fertige NP-Suspension Reste der zum Teil sehr bedenklichen Hilfsstoffe, wie z.B. Radikalstarter.

5 ZELLKULTUR

Obwohl Nanopartikel seit mehr als 25 Jahren bekannt sind (Kreuter 1978; Marty 1978), weiß man zum heutigen Zeitpunkt noch recht wenig über ihr Schicksal nach Applikation. Während die Körperverteilung der Partikelsysteme bereits ausführlich untersucht wurde (Gislain 1983; Tröster 1990; Reddy 2004b), ist die intrazelluläre Lokalisation der Partikel noch weitgehend unklar.

Aus diesem Grund sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit fluoreszierende und elektronendichte NP entwickelt werden. Mit Hilfe dieser modifizierten Nanopartikel wäre ein intrazellulärer Nachweis der Trägersysteme mittels CLSM und TEM möglich.

Die entwickelten Nanopartikel-Zubereitungen sollten zunächst an humanen Makrophagen, CaCo2-Zellen und primären Hirndothelzellen getestet werden. Hierzu wurden die hergestellten NP in einem Konzentrationsbereich von 15 - 250 µg/ml für 1 – 4 Stunden mit den Zellen inkubiert. Als Kontrolle wurde stets die Lösung des reinen Fluoreszenzmarkers mitgeführt, welche im Idealfall zu keiner intrazellulären Fluoreszenz führen sollte (vgl. auch 2.3.1.3).

Makrophagen wurden bereits früher als Model für die Zellaufnahme von Mikro- und Nanopartikeln verwendet (Schäfer 1994), da sie eine hohe phagozytotische Aktivität besitzen und davon auszugehen ist, dass eine deutliche Partikelaufnahme erfolgt. CaCo2 Zellen zeigen eine selektivere Aufnahme und können als stark vereinfachtes Modell der BHS gesehen werden, da diese Epithelzelllinie ebenfalls tight junctions ausbildet, Pgp exprimiert und somit einen erhöhten Widerstand für den Stofftransport und die Arzneistoffaufnahme darstellt. CaCo2 Zellen finden häufig Anwendung bei der Vorhersage der gastrointestinalen Resorption von Arzneistoffen (Artursson 2001; van de Waterbeemd 2005).

Abschließend sollten die entwickelten Systeme an isolierten, primären Hirnendothelzellen getestet werden. Da die Isolierung dieser Zellen recht aufwendig ist und sich die Zellen nicht in Kultur nehmen lassen, war die Testung der Aufnahme in diese Zellen nur für die fortgeschrittenen NP-Formulierungen vorgesehen.

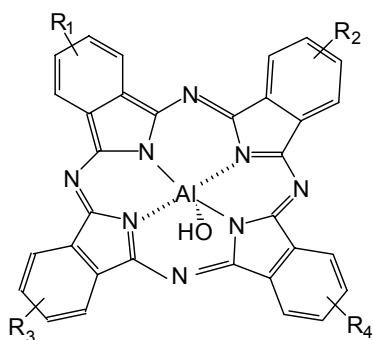
5.1 Aufnahme von Phthalocyanin-markierten Nanopartikeln

Phthalocyanine werden in der photodynamischen Therapie (PDT) bestimmter Tumore eingesetzt (Sibata 2001). Da sie eine sehr hohe spezifische Absorption besitzen und einen Großteil des absorbierten Lichts in Form von Fluoreszenz abgeben, erscheinen sie auch als Fluoreszenzmarker interessant. Die Beladung von Nanopartikeln mit Phthalocyaninen und der Einsatz in der PDT ist bereits in Veröffentlichungen beschrieben (Allemann 1995; Li 2005).

Die hier verwendeten Aluminium-Phthalocyanine (PcAl) und Cobalt-Phthalocyanine (PcCo) wurden im State Research Center of the Russian Federation (NIOPIK) in Moskau entwickelt und besitzen zusätzliche Sulfonsäuregruppen.

Durch ihr zentrales Aluminium- bzw. Cobalt-Atom könnte eine Markierung der Nanopartikel mit den Phthalocyaninen auch zu einer Erhöhung der Elektronendichte des Systems führen, welches für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wünschenswert wäre. Aufgrund ihrer großen Lipophilie ist mit einer guten Bindung an die NP-Matrix zu rechnen.

Abbildung 49 - Al-Phthalocyanin (PcAl)
(Universität Moskau)



A) R1 = R4 = SO₃Na, B) R1 = R2 = R3 = R4 = SO₃Na,
C) R1 = R2 = R3 = SO₃Na

Tabelle 16 – Ausgewählte physikochemische
Eigenschaften des Al-Phthalocyanins

Löslichkeit (in Wasser)	Gering, blau
Fluoreszenz	λ_{ex} 352 nm
	λ_{em} 694 nm

Aus dem Absorptionsspektrum von Aluminium-Phthalocyanin lässt sich erkennen, dass die Substanz keine nennenswerte Absorption im Bereich der Wellenlängen der verwendeten CLSM-Laser zeigt. Einzige Ausnahme ist die Wellenlänge 647 nm, bei der eine Anregung mit dem Cy5-Laser möglich erscheint.

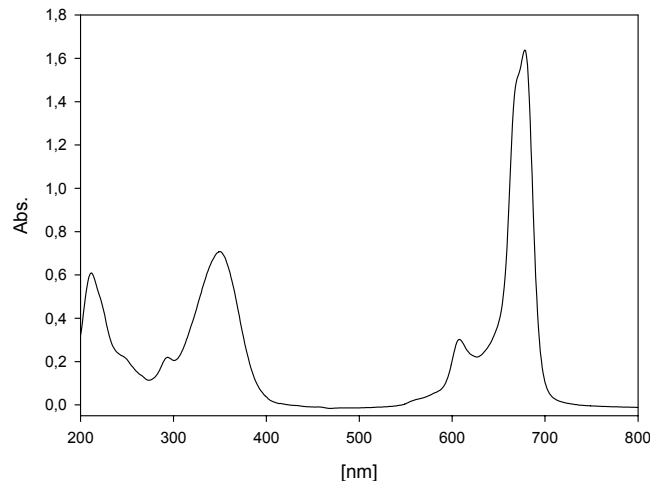


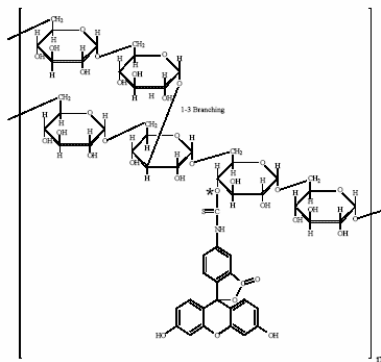
Abbildung 50 - Absorptionsspektrum von PcAl, $c = 10 \mu\text{g/ml}$ in Wasser

Die Gegenwart des Arzneistoffs während der Polymerisationsreaktion führte zu keinen Problemen. Die produzierten NP hatten eine Größe von 168 nm (PD 0,264) und eine Beladung von ca. 87 %. Allerdings zeigen die Ergebnisse aus der Zellkultur mit anschließender CLSM-Auswertung, dass PcAl-NP nur in hohen Konzentrationen ($c > 100 \mu\text{g/ml}$) und nur bei sehr großer Signalverstärkung nachweisbar sind; das verwendete CLSM besitzt keine geeignete Anregungswellenlänge für diese Substanz. Da bei den durchgeführten Zellaufnahme-Studien die Autofluoreszenz der Zellen zum Teil stärker als die partikuläre Fluoreszenz war, wurde diese Formulierung nicht weiterentwickelt. Auch im Hinblick auf eine spätere Anwendung im Rahmen einer Körperverteilungsstudie erscheinen die Pc-NP als nicht geeignet, da sie bei der resultierenden, sehr geringen Konzentration in-vivo nur schwer nachweisbar wären.

5.2 Aufnahme von FITC-Dextran-markierten Nanopartikeln

Fluorescein-isothiocyanat-markiertes Dextran ist kommerziell erhältlich und wird standardmäßig in Perfusionsstudien an Tieren eingesetzt. Für die Markierung der Nanopartikel erscheint dieses Label besonders geeignet, da die nanopartikulären Zubereitungen bereits Dextran als Stabilisator enthalten. Durch Austausch eines Teils des unmodifizierten Dextrans gegen FITC-markiertes Dextran könnte eine schnelle und einfache Markierung erreicht werden.

Abbildung 51 - FITC-Dextran 70.000



Quelle: Sigma

Tabelle 17 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften des FITC-Dextrans

Molekulargewicht	Ca. 70.000 g/mol
Löslichkeit (in Wasser)	25 mg/ml
Fluoreszenz (in Ethanol)	λ_{ex} 490 nm λ_{em} 520 nm

Die in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie verwendeten Laser besitzen die optimale Anregungswellenlänge von 488 nm für diese Substanz.

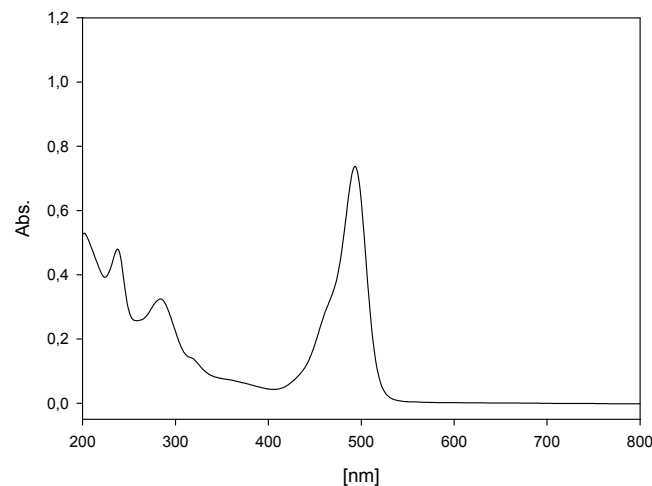


Abbildung 52 - Absorptionsspektrum von FITC-Dextran, $c = 500 \mu\text{g/ml}$ in PBS pH 7

Die Polymerisation lieferte NP mit einem Durchmesser von 177 nm und einer Polydispersität von 0,171. Die Partikel wurden in einer Konzentration von 5 – 50 $\mu\text{g/ml}$ mit Makrophagen für eine Stunde inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Lösung des freien Fluoreszenz-Farbstoffs (ohne NP) in gleicher Konzentration zusammen mit den NP-Proben inkubiert.

Die Versuche führten zu nicht eindeutigen Ergebnissen: Zum Teil war keine Fluoreszenz nachweisbar, teilweise war eine Fluoreszenz bei der FITC-Dextran-Lösung zu beobachten. Da die Lösung des freien Arzneistoffs keine Fluoreszenz zeigen sollte, um bei der späteren Verwendung der markierten NP falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurde diese Formulierung nicht weiterentwickelt (vgl. auch Anforderung an fluoreszenzmarkierte NP 2.3.1.3.).

5.3 Aufnahme von Propidiumiodid-markierten Nanopartikeln

Propidiumiodid ist ein gebräuchlicher Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung des Zellkerns, genauer gesagt der DNS. Aufgrund seiner Ladung kann es die Zellmembran lebender Zellen nicht überwinden. Vor Anfärbung muss die Membran geöffnet, oder die Zelle abgetötet werden. Der Farbstoff findet aufgrund dieser Eigenschaften auch Anwendung beim Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), um apoptotische Zellen zu detektieren (Darzynkiewicz 1992). PI wurde bereits in

früheren Versuchen als Fluoreszenzfarbstoff für PBCA-Nanopartikel verwendet (Zimmer 1991).

Abbildung 53 - Propidiumiodid

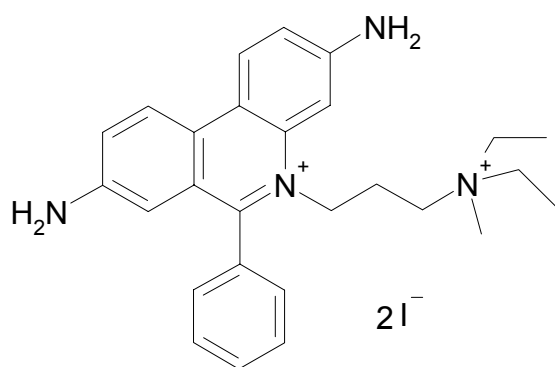
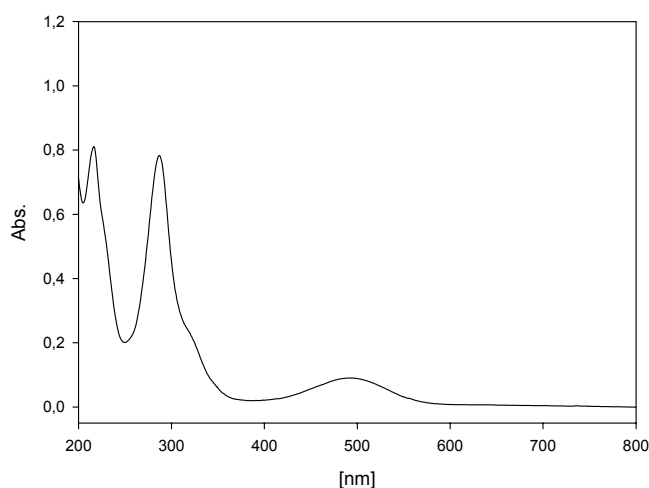


Tabelle 18 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften des Propidiumiodids

Molekulargewicht	668.39 g/mol
Summenformel	$C_{27}H_{34}N_4I_2$
Schmelzpunkt	220-225 °C
Löslichkeit (in Wasser)	1 mg/ml, rot
Fluoreszenz (in Wasser)	λ_{ex} 493 nm λ_{em} 636 nm

Als Anregungswellenlänge kommt der FITC-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und der TRITC-Laser mit einer Wellenlänge von 568 nm in Betracht. Im Vergleich zu den Phthalocyaninen besitzt Propidiumiodid eine deutlich geringere spezifische Absorption und Fluoreszenzausbeute.

Abbildung 54 - Absorptionsspektrum von Propidiumiodid, $c = 10 \mu\text{g/ml}$ in PBS pH 7

Der mittlere Durchmesser der verwendeten NP betrug 385 nm (PD 0,463). Bei der Inkubation mit CaCo2-Zellen in einem Konzentrationsbereich von 25 - 50 µg/ml PBCA bzw. 1 – 2 µg/ml PI wurde beobachtet, dass nanopartikuläres, als auch freies PI in die Zellen aufgenommen wird. Die Fluoreszenz scheint in beiden Fällen im Zellkern konzentriert zu sein, was die Anwendung der Substanz als intrazelluläres Label für NP als nicht geeignet erscheinen lässt, da mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung die Lokalisation der NP innerhalb der Zelle (z.B. in den Endosomen, Lysosomen und dem Cytoplasma) nachgewiesen werden soll.

Es soll erwähnt werden, dass die gezeigte Aufnahme von freiem PI durch lebende Zellen im Widerspruch zu den Beobachtungen von Zimmer et al. und der weit verbreiteten Anwendung der Substanz als Marker für apoptotische Zellen steht.

5.4 Aufnahme von DTAF-Nanopartikeln in Makrophagen

5-(4,6-Dichloro-s-triazin-2-ylamino)fluorescein (DTAF) ist ein fluoreszierendes Reagenz, welches häufig zur Markierung von Proteinen verwendet wird. Es besitzt ein dem FITC-Dextran vergleichbares Absorptionsspektrum und lässt sich gut mit dem 488 nm-Laser (FITC) zur Fluoreszenz anregen.

Abbildung 55 - DTAF

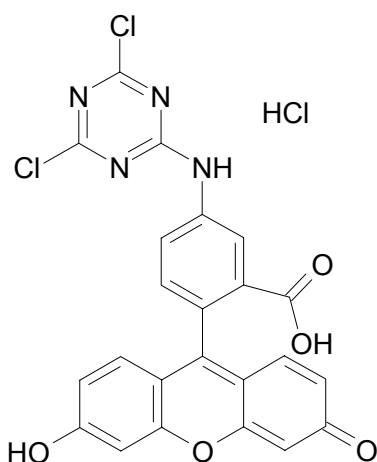


Tabelle 19 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften des DTAF

Molekulargewicht	531,73 g/mol
Summenformel	C ₂₃ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O ₅ HCl
Schmelzpunkt	> 325 °C
Löslichkeit (in Wasser)	Mäßig
Fluoreszenz	λ_{ex} 495 nm
	λ_{em} 516 nm

Die Substanz besitzt eine hohe Fluoreszenzausbeute und zeigt ein sehr spezifisches Absorptionsspektrum.

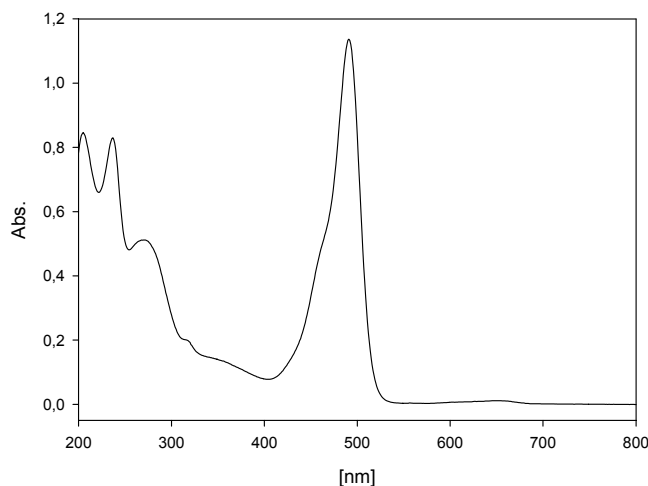


Abbildung 56 - Absorptionsspektrum von DTAF, c = 10 µg/ml in PBS pH 7

DTAF reagiert im wässrigen Milieu mit primären und sekundären Aminen und führt so zu einer kovalenten Fluoreszenzmarkierung von Proteinen. Zum Teil wird es auch in freier Form in der Zellkultur eingesetzt und reagiert dann mit den Aminen der Zellmembran und den intrazellulären Proteinen (Henriques 2000). Unter günstigen Bedingungen reagiert DTAF auch mit reaktiven Alkoholen und kann zur Markierung von Dextranen und Heparinen eingesetzt werden (Letourneur 1993). Das zur Nanopartikelherstellung verwendete Polyalkylcyanoacrylat besitzt keine Aminogruppen, weist jedoch eine endständige OH-Funktion auf, welche bei günstigen Bedingungen (pH > 9, keine weiteren Nucleophile zugegen) auch mit diesem Reagenz zu markieren sein könnte.

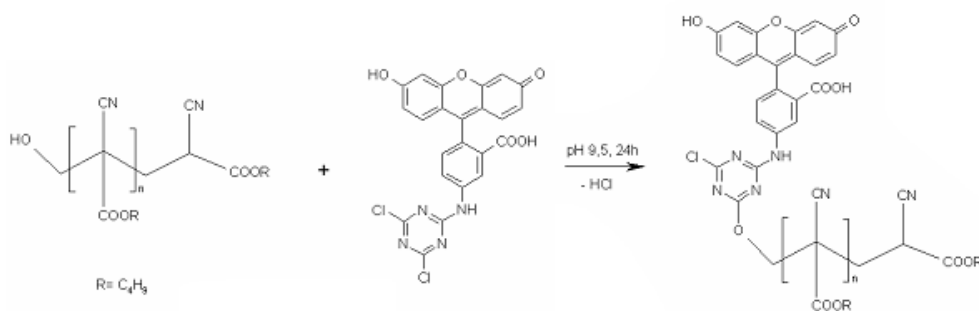


Abbildung 57 - mögliches Reaktionsschema der DTAF-Markierung

Auch nach Umsetzung der NP-Suspension mit DTAF war keine signifikante Änderung der Größe und Polydispersität der Partikel zu verzeichnen.

Erste Zellaufnahme-Versuche mit DTAF-NP zeigten eine viel versprechende intrazelluläre Fluoreszenz, welche allerdings auch bei Applikation der nanopartikel-freien DTAF-Lösung zu detektieren war.

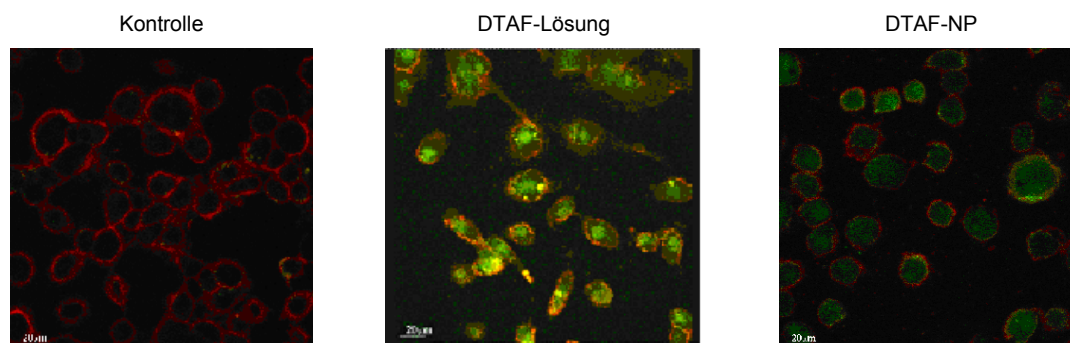


Abbildung 58- Aufnahme von DTAF-Lsg. und DTAF-NP in Makrophagen nach 1 h Inkubation, $c(\text{PBCA}) = 25 \mu\text{g/ml}$, Zellmembranfärbung: TRITC-Con A

Da auch das freie Label zu CLSM-Aufnahmen führt, die eine intrazelluläre Aufnahme von NP vermuten lässt, muss bei Anwendung dieser Markierung sichergestellt sein, dass die NP-Zubereitung kein freies Fluoreszenz-Label enthält, welches zu falsch positiven Ergebnissen führen würde.

Eine kovalente Bindung des DTAF an das Polymer, wie sie von Weyermann et al. (Weyermann 2004) angenommen wurde, konnte massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Da das Label auch beim Waschen der Nanopartikel mit Puffer freigesetzt wird, scheint es sich auch bei diesem Farbstoff lediglich um eine adsorptive Bindung zu handeln.

5.5 Aufnahme von Rhodamin-6G-Nanopartikeln in Makrophagen

Rhodamin-6G findet bei in-vitro Versuchen zur Pgp-Expression Anwendung. Es ist selbst ein Pgp-Substrat und gibt daher Auskunft über die Aktivität des Efflux-Transporters. Rhodamin-6G wurde bereits in früheren Arbeiten zur adsorptiven Markierung der PBCA-NP verwendet (Zimmer 1991; Ramge 2000).

Abbildung 59 - Rhodamin-6G

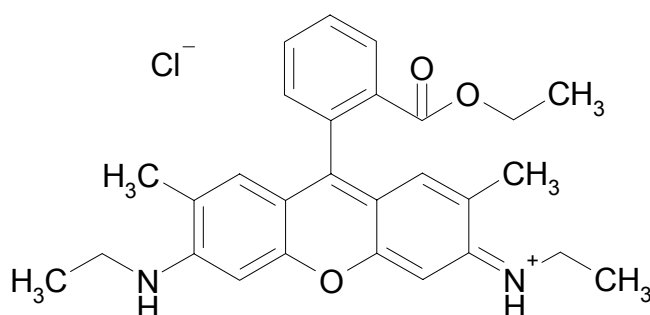


Tabelle 20 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften des Rhodamin-6G

Molekulargewicht	479,01 g/mol
Summenformel	C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₃ Cl
Löslichkeit (in Wasser)	1 mg/ml, rot
Fluoreszenz (in Methanol)	λ_{ex} 528 nm λ_{em} 547 nm

Das Absorptionsspektrum zeigt eine gute Anregungsmöglichkeit im Bereich des TRITC-Lasers (568 nm).

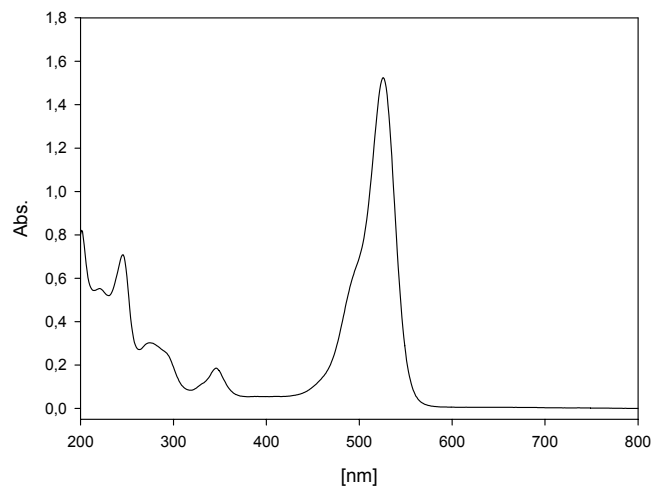


Abbildung 60 - Absorptionsspektrum von Rhodamin-6G, $c = 10 \mu\text{g/ml}$ in PBS pH 7

Die hergestellten Partikel unterschieden sich im Partikeldurchmesser (187,8 nm) und der Polydispersität (0,106) nicht von unmarkierten NP.

Nachfolgend sind CLSM-Aufnahmen mit nanopartikulärem Rhodamin-6G und freiem Rhodamin-6G in Makrophagen abgebildet.

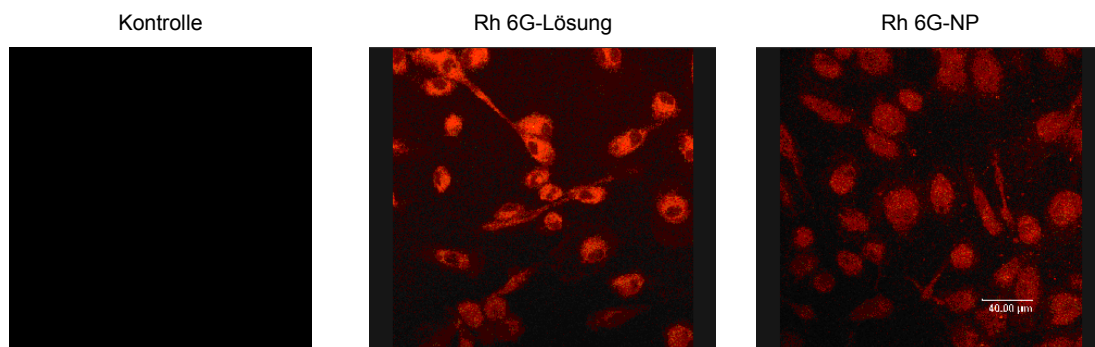


Abbildung 61- Aufnahme von Rh 6G-Lsg. und Rh 6G-NP in Makrophagen nach 1 h Inkubation, $c(\text{PBCA}) = 250 \mu\text{g/ml}$, $c(\text{Rh 6G}) = 4,4 \mu\text{g/ml}$

Die Verwendung von NP führt zu einem veränderten Verteilungsmuster der Substanz innerhalb der Zelle. Während freies Rhodamin-6G sich nur im Cytoplasma anreichert, kann der Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe der NP auch in den Zellkern gelangen.

5.6 Aufnahme von Rhodamin-6G-Nanopartikeln in CaCo2-Zellen

Auch bei Applikation der Rhodamin-6G-Zubereitungen in CaCo2-Zellen zeigt sich ein zu den Makrophagen vergleichbares Bild. Sowohl nanopartikuläres Rhodamin-6G als auch die freie Rhodamin-6G-Lösung werden aufgenommen. Bei Verwendung der freien Lösung wird auch hier der Zellkern von der Fluoreszenz ausgespart, wohingegen die Applikation der nanopartikulären Zubereitung zu einer Anfärbung des gesamten Zellinneren führt.

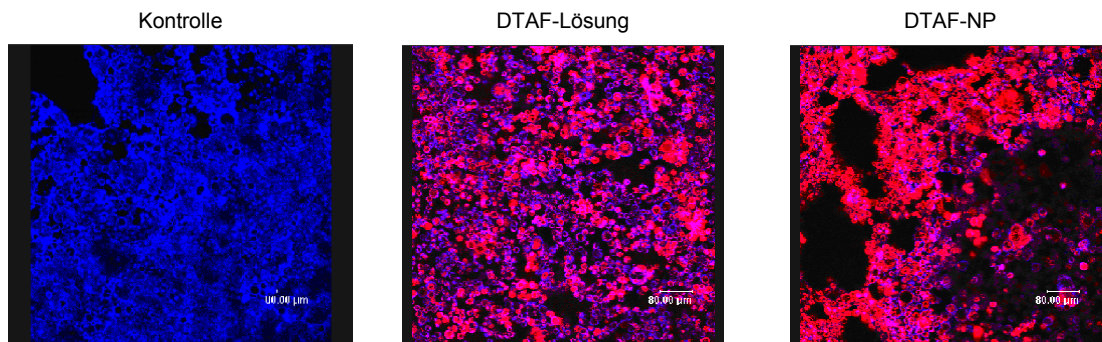


Abbildung 62- Aufnahme von Rh-Lsg. und Rh-NP in CaCo2-Zellen nach 2 h Inkubation, $c(\text{PBCA}) = 100 \mu\text{g/ml}$, $c(\text{Rh } 6\text{G}) = 0,5 \mu\text{g/ml}$, Zellmembranfärbung: Alexa647-Con A

5.7 Aufnahme von Rhodamin-123-Nanopartikeln in 9L-Tumorzellen

Rhodamin-123 ist, wie Rhodamin-6G, ein Pgp-Substrat und wird häufig in der Flow-Cytometry oder der Fluoreszenzmikroskopie als Aktivitätsmarker für diesen Efflux-Transporter verwendet (Batrakova 2001a).

Abbildung 63 - Rhodamin-123

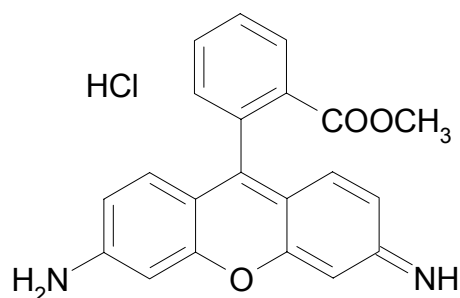


Tabelle 21 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften des Rhodamin-123

Molekulargewicht	380,8 g/mol
Summenformel	C ₂₁ H ₁₇ ClN ₂ O ₃
Löslichkeit (in Wasser)	Ca. 1 mg/ml
Fluoreszenz (in Methanol)	λ_{ex} 507 nm λ_{em} 529 nm

Die NP-Zubereitung wurde mit Pgp-positiven 9L Tumorzellen inkubiert, welche das freie Rhodamin-123 nicht aufnehmen. Erst durch Inhibition des Efflux-Transporters bzw. Verwendung eines speziellen Trägersystems kann der Farbstoff intrazellulär angereichert werden. Aus diesem Grund wurden in diesem Versuch zusätzlich P85-überzogene und PS80-überzogene NP eingesetzt. Beide Substanzen sind als Inhibitor von Pgp bekannt.

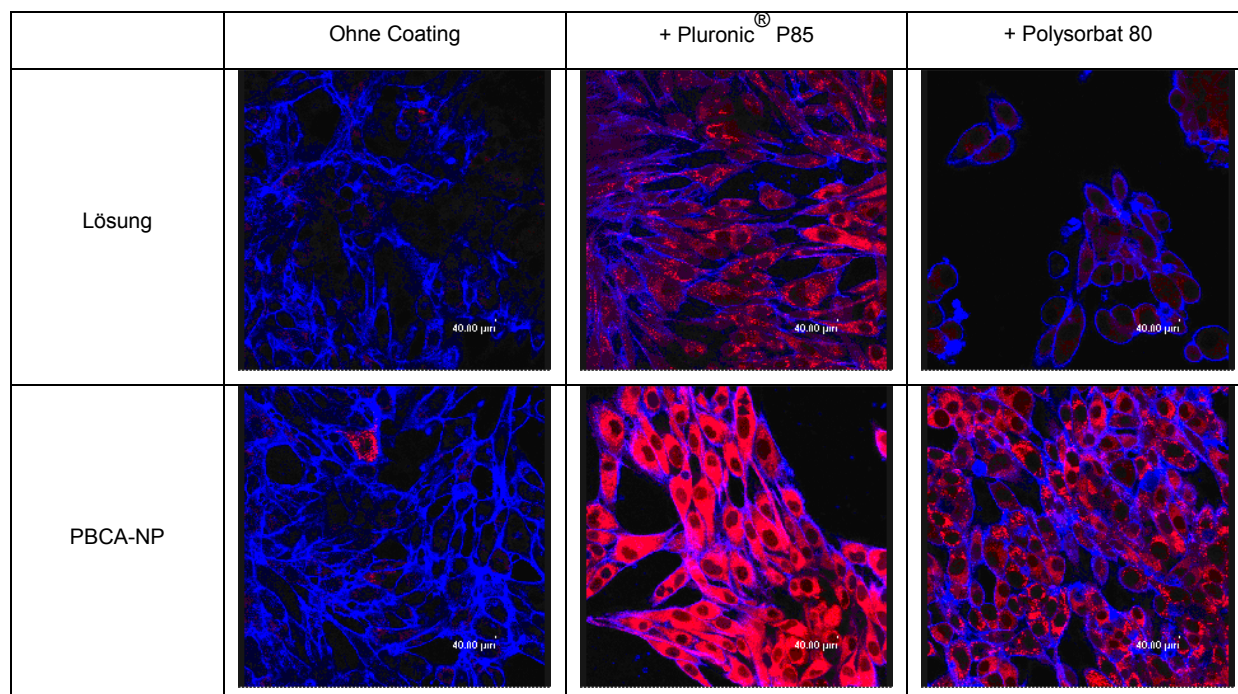


Abbildung 64 - Inkubation von Rhodamin-123-NP mit 9L Zellen nach 6 h ohne Coating und mit Pluronic[®] P85 bzw. Polysorbat 80 Coating, c(PBCA) = 10 µg/ml \cong c(Rh) = 0,5 µg/ml

Es ist deutlich zu erkennen, dass der freie Marker nicht aufgenommen wird. Auch die nicht-überzogene NP-Formulierung zeigt kaum intrazelluläre Fluoreszenz. Durch Zugabe von Polysorbat 80 kann die Aufnahme der Lösung leicht verbessert werden; eine gesteigerte Aufnahme des Markers ist bei PS80-gecoateten NP zu erkennen. Am eindrucksvollsten ist die Steigerung der Farbstoffaufnahme bei P85 zu beobachten. Bereits der Zusatz von P85 zur freien Rhodamin-Lösung führt zu einer deutlichen Aufnahme des Pgp-Substrates; das Coating der Rhodamin-123-NP mit P85 zeigt bei weitem den ausgeprägtesten Effekt.

PBCA-NP und Pluronic® P85 scheinen synergistisch zu wirken und die Aufnahme von Rhodamin-123 in multidrug resistente Zellen, wie etwa die Tumorzelllinie 9L, zu verbessern.

5.8 Aufnahme von Nile Red-Nanopartikeln in Makrophagen

Nile Red ist ein ungeladener Phenoxazon-Farbstoff und zeigt starke Wechselwirkungen mit Proteinen und lipophilen Oberflächen. Die Fluoreszenz des Farbstoffs ist stabil im pH Bereich zwischen 4,5 und 8,5 (Sackett 1987). Die Verwendung von Nile Red als Label für PACA-NP wurde unter anderem von Garcia-Garcia vorgeschlagen (Garcia-Garcia 2005). Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit kann dieser Farbstoff nur über die Nanopräzipitation, bei dem der Farbstoff in Aceton gelöst wird, in die NP eingebracht werden.

Die geringe Wasserlöslichkeit der Substanz ist viel versprechend, da der nanopartikulär-gebundene Fluoreszenzfarbstoff folglich nur eine schlechte Freisetzung zeigen sollte. Es ist unwahrscheinlich, dass die geringen Mengen an frei vorliegendem, gelösten Farbstoff zu einer detektierbaren Anfärbung der Zelle führen.

Abbildung 65 - Nile Red

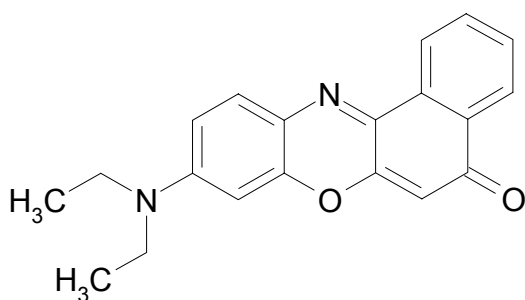


Tabelle 22 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften des Nile Red

Molekulargewicht	318,37 g/mol
Summenformel	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂
Schmelzpunkt	203 – 205°C
Löslichkeit (in Wasser)	< 1,5 µg/ml
Fluoreszenz (in Methanol)	<div> λ_{ex} 530 nm λ_{em} 635 nm </div>

Die über die Nanopräzipitation hergestellten NP hatten eine Größe von 175,2 nm und eine PD von 0,0254. Das Zetapotential dieser Partikel war negativer (- 20,7 mV) als das Potential von leeren Partikeln, welche durch Emulsionspolymerisation hergestellt wurden (- 11,7 mV). Dies scheint jedoch nicht durch den adsorbierten Farbstoff Nile Red zustande zu kommen, da dieser Unterschied auch bei leeren NP, welche durch Nanopräzipitation hergestellt wurden, erkennbar ist. Die Ursache scheint vielmehr im verwendeten Herstellungsverfahren zu liegen. Eventuell sind Restmengen an

Aceton, welche auf der Oberfläche der NP adsorbiert sind, für diesen Effekt verantwortlich.

Erste Ergebnisse in CaCo2-Zellen zeigten, dass Nile Red-markierte Partikel in einer Konzentration von 100 µg/ml zu einer starken intrazellulären Fluoreszenz führen. Allerdings führt auch eine gesättigte Nile Red-Lösung in Wasser zu einer starken intrazellulären Fluoreszenz. Anscheinend wird der freie Farbstoff leicht von den Zellen aufgenommen, akkumuliert intrazellulär und erzeugt ein starkes Fluoreszenzsignal.

5.9 Abschließende Bewertung der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel

Keiner der vorgestellten Ansätze führte zu einer sicheren Fluoreszenzmarkierung der PBCA-NP. Die Farbstoffe Al-Phthalocyanin, FITC, Propidiumiodid, Rhodamin-6G und Rhodamin-123 waren nur durch Adsorption an die Oberfläche der PBCA-NP gebunden. Bei dieser Art der Bindung besteht die Gefahr, dass der Farbstoff nach Verdünnung der NP-Suspension, wie sie z.B. bei der Inkubation in der Zellkultur stattfindet, freigesetzt wird. Die Freisetzung des Farbstoffs beim Waschen der NP konnte bei allen oben genannten Zubereitungen beobachtet werden. Solange nicht ausgeschlossen werden kann, dass der freie Arzneistoff intrazellulär aufgenommen wird, erscheint die Verwendung dieser Markierungen als höchst unsicher.

Die Herstellung von Nile Red-NP durch Nanopräzipitation könnte zu Nanokapseln führen, welche den Fluoreszenzfarbstoff im Inneren „verkapselt“ tragen und nur sehr langsam freisetzen. Dennoch ist auch hier die Gefahr gegeben, dass freigesetztes Label in freier Form in die Zellen gelangt.

Die sicherste Markierung der NP erscheint durch eine kovalente Bindung des Fluoreszenzmarkers an PBCA möglich. Allerdings handelt es sich beim eingesetzten Polymer um ein höchst unreaktives Molekül.

Der Markierungsversuch mit DTAF im wässrigen Milieu bei pH 9 führte zu keinem Ergebnis. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Versuch der kovalenten Bindung mit einem Perylenfarbstoff durchgeführt. Diese Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Ingo Oesterling in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Müllen und Dr. Andreas Hermann am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz. Der Versuch wurde unter Verwendung von zwei verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt.

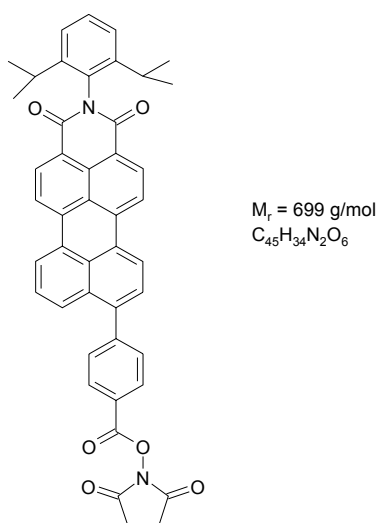


Abbildung 66 - Strukturformel des NHS-Aktivesters des verwendeten Perylenfarbstoffs

Als Farbstoff wurde der NHS-Aktivester eines Perylenfarbstoffs verwendet. Für die Konjugation wurde das aus IndermilTM synthetisierte Polymer zusammen mit dem Farbstoff in Tetrahydrofuran (THF) bzw. Dimethylformamid (DMF) gelöst und 4 Tage bei 40°C unter Rückfluss und Schutzgas gerührt. Im Falle von THF wurde eine geringe Menge Triethanolamin als Katalysator zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mittels HPLC und MS untersucht. Leider konnte auch hier nach Aufreinigung des Ansatzes kein Konjugat aus PBCA und dem Perylen nachgewiesen werden. Die vorhandene, endständige Alkoholfunktion des Polymers erscheint unter den verwendeten Reaktionsbedingungen als zu unreaktiv, um für Modifikationen des Polymers hilfreich zu sein.

Um eine sichere kovalente Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an die Polymermatrix der Nanopartikel zu gewährleisten, bieten sich aus meiner Sicht zwei Methoden an:

Zum einen könnte durch partielle Verseifung des Polymers eine reaktive Carbonsäurefunktion erhalten werden, an welche mittels Proteinchemie ein Aminogruppen-tragender Fluoreszenzfarbstoff (z.B. 5-(Aminomethyl)fluorescein) konjugiert werden könnte.

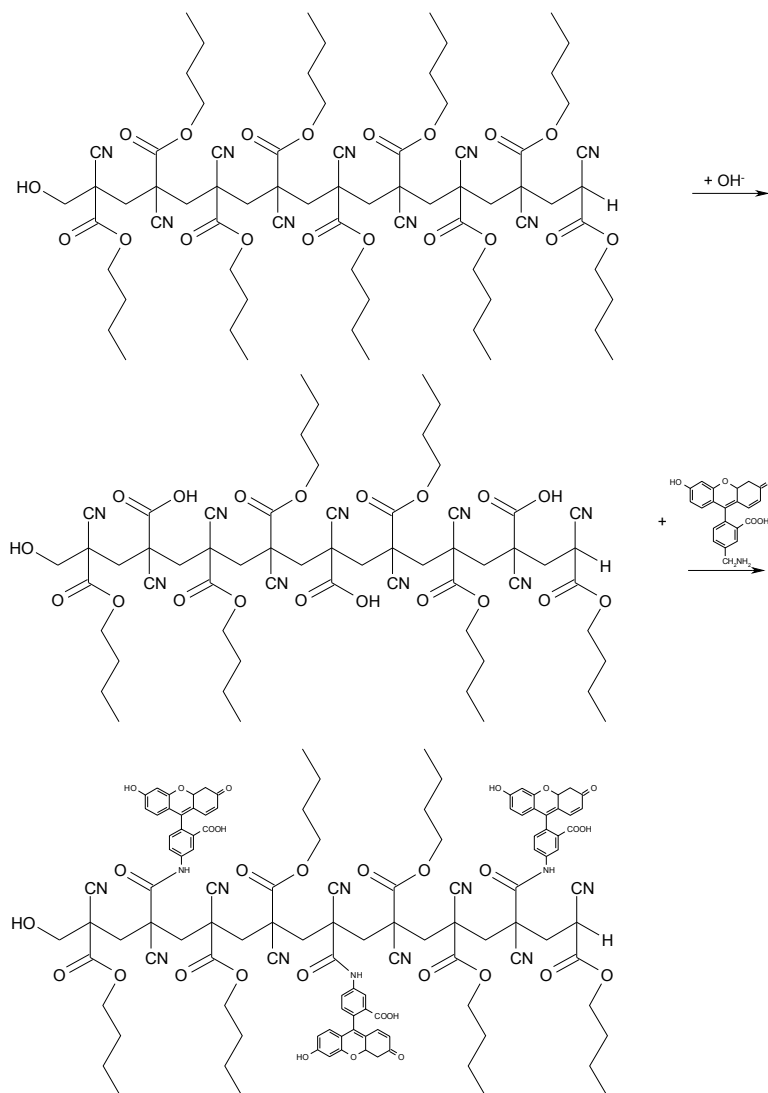


Abbildung 67 - Mögliche Modifizierung von PBCA über partielle Hydrolyse und Konjugation eines Fluoreszenzfarbstoffs über eine Amidbindung

Die partielle Hydrolyse von PBCA wird bereits von der Schering AG genutzt, um PBCA-Mikropartikel zu modifizieren (Joseph 2004). Da diese Verseifung stöchiometrisch abläuft, kann die zur partiellen Hydrolyse benötigte Menge an NaOH berechnet und der Reaktionsverlauf über die Änderung des pH-Werts beobachtet werden (Olbrich 2005).

Zum anderen besteht die Möglichkeit das Polymer selbst zu synthetisieren und während der Synthese reaktive Gruppen einzuführen. So synthetisierten Peracchia et al. ausgehend von MePEG, Hexadecanol und Cyanoessigsäure ein Poly(MePEGcyanoacrylat-hexadecylcyanoacrylat)-Copolymer (Peracchia 1997a). Es erscheint möglich, anstelle von MePEG ein geschütztes Amino-PEG einzusetzen, an dessen Aminofunktion später ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden werden kann.

Der erstgenannten Methode ist der Vorzug zu geben, da sie mit geringerem Aufwand durchführbar ist und zu einem Polymer führt, welches eine nahe Verwandtschaft zum ursprünglichen PBCA aufweist.

5.10 Aufnahme von freiem Doxorubicin und Doxorubicin-Nanopartikeln in CaCo2-Zellen

Im Folgenden ist die Aufnahme von DOX-Lösung und DOX-NP in CaCo2-Zellen gezeigt. Doxorubicin eignet sich nicht zur Fluoreszenzmarkierung der Partikel, weil es (i) auch in freier Form von vielen Zellen aufgenommen wird und (ii) nur adsorptiv an die NP gebunden ist. Jedoch lassen sich durch die folgenden CLSM-Aufnahmen die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Aufnahme zwischen freiem und nanopartikulär gebundenem Arzneistoff und der Einfluss des Tensid-Coatings demonstrieren.

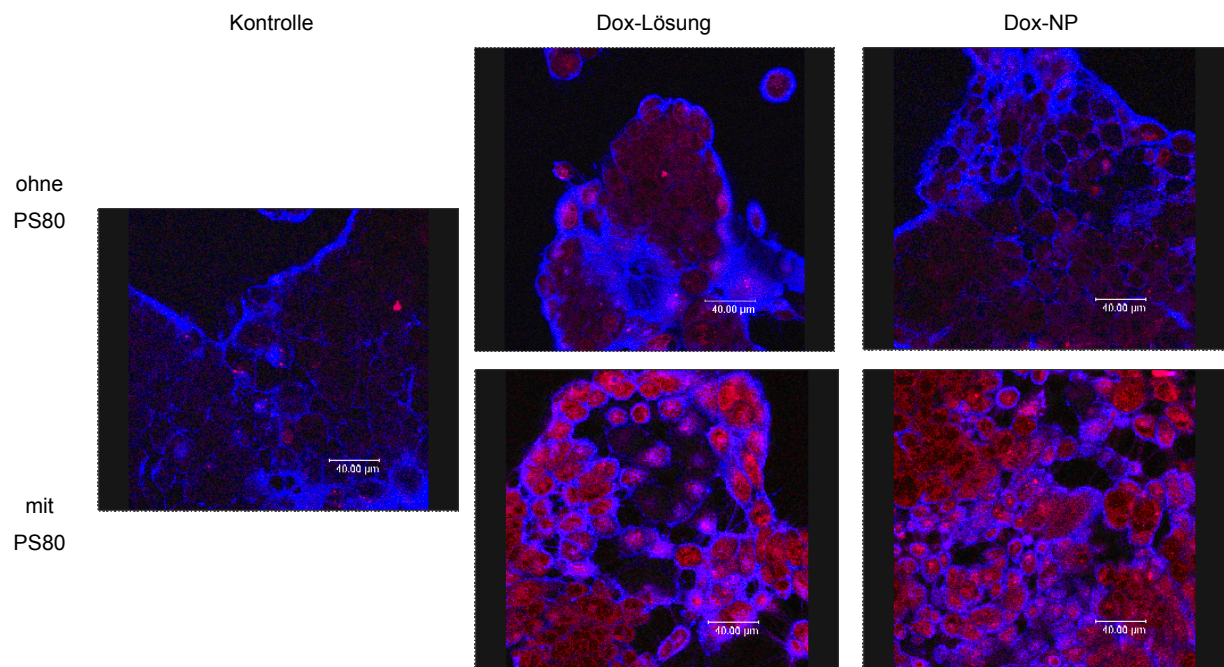


Abbildung 68- Aufnahme von Doxorubicin-Lösung. und Doxorubicin-NP in CaCo2-Zellen nach 3h Inkubation, c(PBCA) = 10 µg/ml, Zellmembranfärbung: Alexa647-Con A

Die Kontrolle zeigt außer der blauen Fluoreszenz der Alexa647-Zellmembranmarkierung nur eine sehr schwache rote Autofluoreszenz. Nach Zugabe von Doxorubicin-Lösung und Doxorubicin-beladenen NP ist eine leichte Zunahme der Fluoreszenz zu erkennen. Bei Zusatz von 1% PS80 zur Lösung und bei PS80-überzogenen NP ist eine deutliche Steigerung in der Arzneistoffaufnahme sichtbar.

Um die Kinetik der Aufnahme näher zu untersuchen, wurden CaCo2-Zellen mit tensidhaltiger DOX-Lösung inkubiert. In regelmäßigen Abständen zwischen 0 und 180 Minuten wurden CLSM-Aufnahmen gefertigt. Nach mehr als 180 min konnte bei allen Doxorubicin-haltigen Zubereitungen ein Absterben der Zellen beobachtet werden.

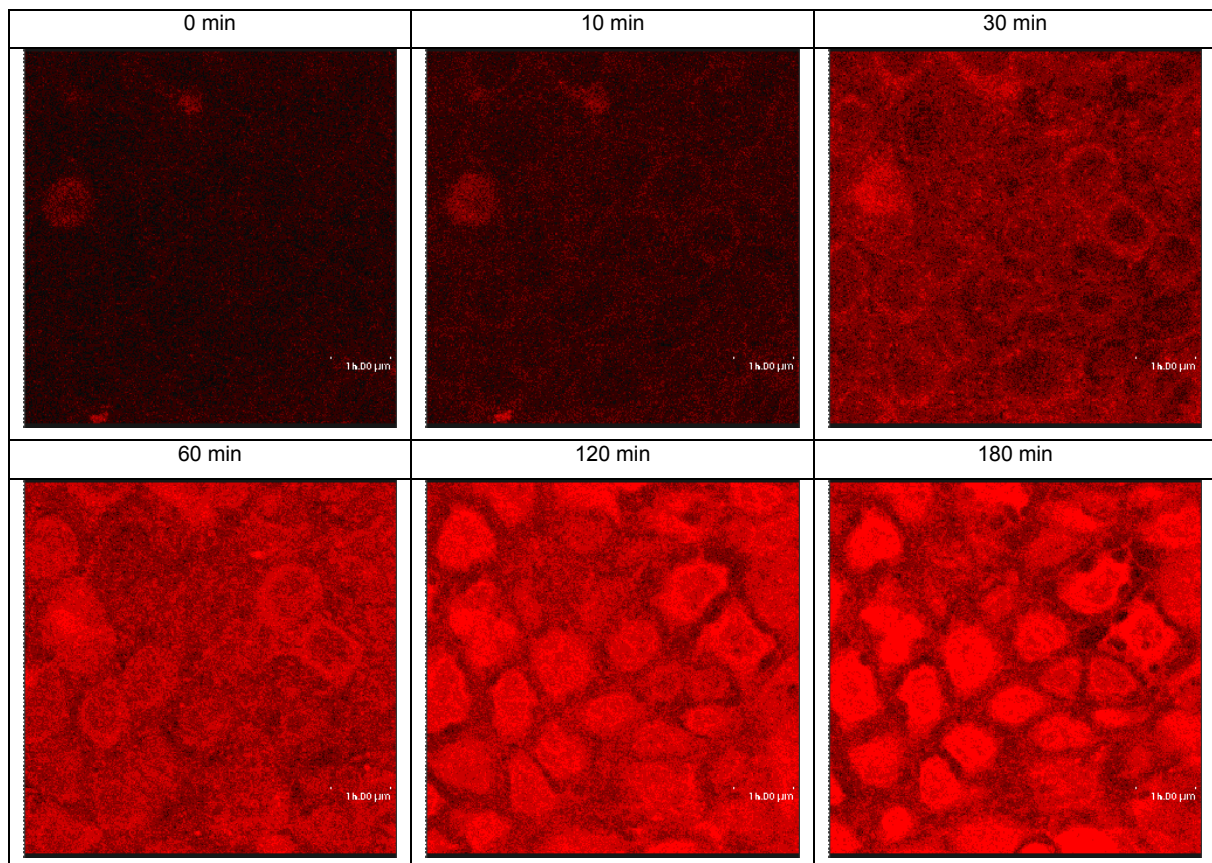


Abbildung 69 - Zeitabhängige Aufnahme von Dox-Lösung mit Polysorbat 80 (1 %) in CaCo2-Zellen,
 $c(\text{Dox}) = 25 \mu\text{g/ml}$

6 CHEMOTHERAPIE MIT DOXORUBICIN-ZUBEREITUNGEN

Der durchgeführte Tierversuch diente zur Untersuchung der Wirksamkeit der Doxorubicin-Zubereitungen gegen Tumore des ZNS. Hierzu wurde gesunden männlichen Wistar-Ratten ein Glioblastom intrakranial implantiert. Im Anschluss erfolgte eine Chemotherapie mit verschiedenen Zubereitungen:

1. Doxorubicin-Lösung
2. Doxorubicin-Lösung + 1 % PS80
3. Doxorubicin-Lösung + 1 % F68
4. Doxorubicin-Lösung + 1 % P85
5. Doxorubicin-Lösung + 1 % L61
6. Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP
7. Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP + 1 % PS80
8. Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP + 1 % F68
9. Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP + 1 % P85
10. Dextran-stabilisierte Doxorubicin-NP + 1 % L61
11. Dextran-stabilisierte leere NP + Doxorubicin + 1 % PS80 (Mischung)
12. F68-stabilisierte Doxorubicin-NP
13. F68-stabilisierte Doxorubicin-NP + 1 % PS80

Die Versuchstiere erhielten die Doxorubicin-haltigen Zubereitung an den Tagen 2, 5 und 8 nach der Implantation des Tumors als Injektion in die Schwanzvene. Die Dosierung wurde an das Körpergewicht der Tiere angepasst und betrug 3 x 1,5 mg/kg Doxorubicin.

Die physikochemischen Eigenschaften der in der Chemotherapie verwendeten Nanopartikel-Zubereitungen können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden:

Tabelle 23 - Ausgewählte physikochemische Eigenschaften der eingesetzten DOX-NP

DOX-NP	Durchmesser [nm]	Partikelausbeute [%]	Arzneistoffbeladung [%]	Zetapotential [mV]
Dextran-stabilisiert	202 ± 10	68,3	65 ± 11	13,0 ± 2,1
F68-stabilisiert	246 ± 11	64,2	45 ± 11	29,6 ± 2,0

6.1 Doxorubicin-Lösungen

Gelperina et al., und Steiniger et al., konnten zeigen, dass Polysorbat 80-überzogene Doxorubicin-Nanopartikel einen starken Effekt im Ratten-Tumor-Modell ausüben (Gelperina 2002; Steiniger 2004): Bei 22 % (5/23) der Versuchstiere konnte eine Langzeitremission (> 180 Tage) des ZNS-Tumors erreicht werden.

In der Literatur finden sich Vermutungen, dass diese Wirkung auf eine unspezifische Toxizität des Trägersystems gegenüber den Endothelzellen (Olivier 1999) oder auf die Hemmung des Pgp durch PS80 zurückzuführen ist (Lo 2003). Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen wurden im vorliegenden Tierversuch Doxorubicin-Lösungen mit Tensidzusatz mitgeführt. Sollte der verbesserte Transport der Substanz über die BHS tatsächlich nur auf den Zusatz des Tensids zurückzuführen sein, so müssten auch diese Zubereitungen einen deutlichen antitumoralen Effekt zeigen.

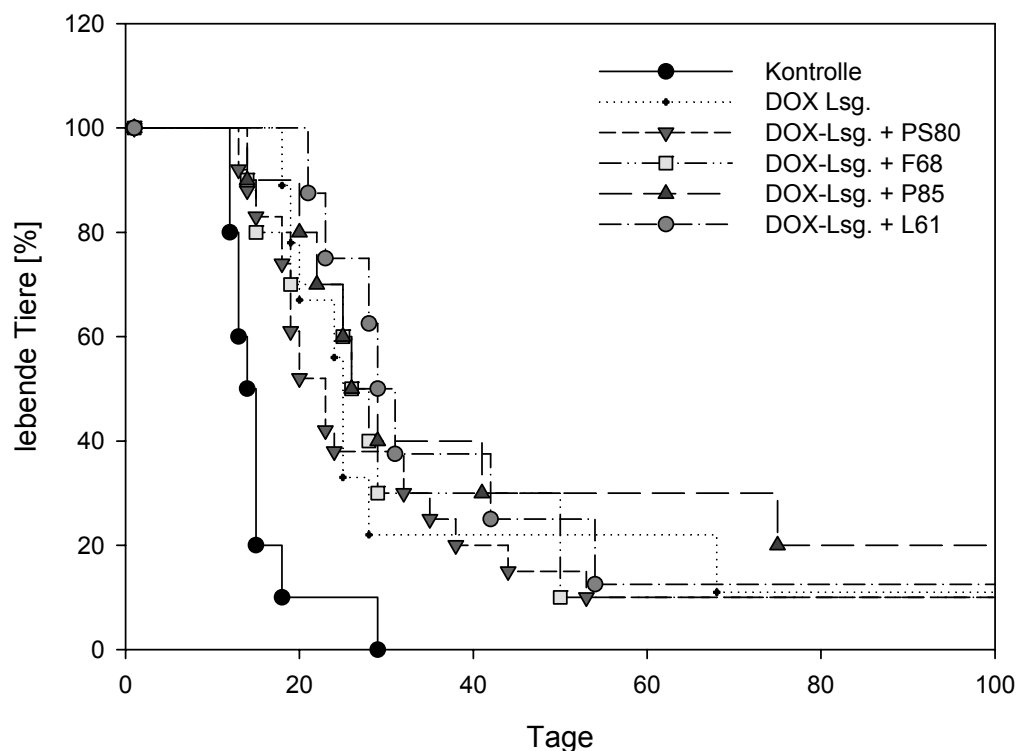


Abbildung 70 - Kaplan-Meier Plot: Vergleich verschiedener Doxorubicin-Lösungen

Zu erkennen ist, dass die Doxorubicin-Lösung, welche zusätzlich 1 % Pluronic® P85 enthält, den stärksten antitumoralen Effekt zeigt: 20 % der Tiere zeigten eine Langzeitremission des Tumors. Dieser verstärkte Effekt ist wahrscheinlich auf eine Hemmung des Effluxtransporters Pgp zurückzuführen. P85 ist als starker Inhibitor von Pgp bekannt (Batrakova 2001a; Batrakova 2001b).

Die reine Doxorubicin-Lösung und die Zubereitungen mit 1 % Pluronic® L61, F68 und PS80 zeigen ebenfalls eine antitumorale Wirkung, jedoch ist diese mit ca. 10 % schwächer ausgeprägt als bei P85. Alle unbehandelten Tiere verstarben innerhalb der ersten 30 Tage, was beweist, dass die Tumorimplantation erfolgreich verlaufen ist und der Tumor ein aggressives Wachstum besitzt.

6.2 Dextran-stabilisierte Doxorubicin-Nanopartikel

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Dextran-stabilisierte DOX-Nanopartikel durch das Coating mit verschiedenen Tensiden eine Wirkungsverstärkung gegenüber dem bisherigen „Gold-Standard“ DOX-NP + Polysorbat 80 zeigen. Hierzu wurden die Arzneistoff-beladenen NP neben Polysorbat 80 auch mit Tensiden der Pluronic®-Familie (F68, P85, L61) überzogen. Die Konzentration aller Tenside betrug 1% (m/V).

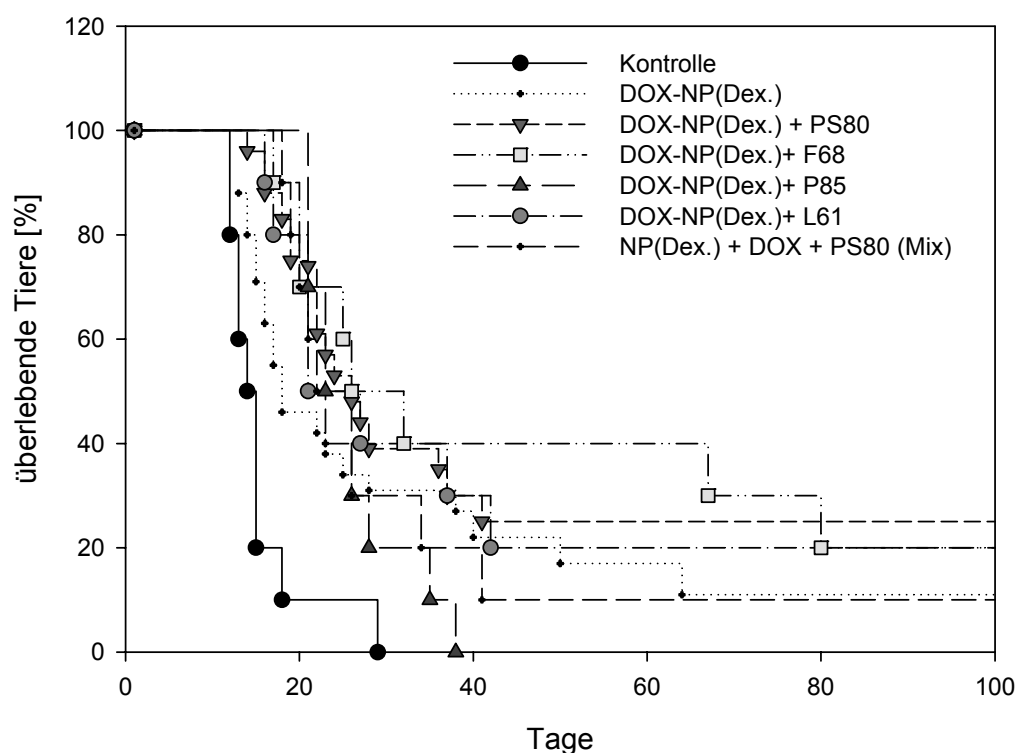


Abbildung 71 - Kaplan-Meier Plot: Vergleich verschiedener Dextran-stabilsierter Doxorubicin-NP - Einfluss des Coatings

Leider zeigten die neuen Zubereitungen im Vergleich zur bisherigen Standardformulierung keine erhöhte Wirksamkeit. Nach wie vor sind Polysorbat 80-überzogene DOX-NP die wirksamste Formulierung (25 % Remission). Allerdings führte die Behandlung der tumortragenden Ratten mit L61- und F68-überzogenen DOX-NP beachtenswert zu je 20% Remission. Hierbei zeigten die F68-gecoateten NP zwischen Tag 32 und 67 eine deutlich erhöhte Wirksamkeit gegenüber allen

anderen Zubereitungen. Ungecoatete DOX-NP zeigten ähnlich wie die Mischung von leeren NP, Doxorubicin und Polysorbat 80 nur einen schwachen Effekt.

Dass die Mischung von Polysorbat 80, Doxorubicin und PBCA nur einen schwachen Effekt zeigte, deckt sich mit Beobachtungen früherer Arbeiten (Alyautdin 1995; Alyautdin 1997). Offensichtlich müssen Doxorubicin und Polysorbat 80 an der Oberfläche gebunden vorliegen, um effektiv wirken zu können.

Noch ungeklärt ist, wieso die P85-überzogene NP-Zubereitung nahezu keine Wirkung zeigte.

6.3 Pluronic® F68-stabilisierte DOX-Nanopartikel

Neben der Verwendung von Dextran als Stabilisator für die Emulsionspolymerisation lassen sich PBCA-NP unter anderem auch mit Pluronic® F68 herstellen. Wie im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, zeichnen sich diese Nanopartikel durch eine besonders enge Größenverteilung und eine definierte Massenverteilung aus.

Da die Verwendung von Pluronic® F68 als Überzugstensid für Dextran-stabilisierte NP auch im Tierversuch zu einer beachtlichen Remission bei 20 % der Ratten geführt hat, ist denkbar, dass F68-stabilisierte DOX-NP bereits ohne weitere Oberflächenmodifikationen einen antitumoralen Effekt ausüben. Darüber hinaus wurde in früheren Studien bereits gezeigt, dass auch Polysorbat 80-überzogene Pluronic® F68-stabilisierte PBCA-NP die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Alyautdin 1997). Für den Arzneistoff Camptothecin konnte eine verbesserte Gehirngängigkeit mit ungecoateten Pluronic®-stabilisierten NP nachgewiesen werden (Yang 1999). Aus diesen Gründen wurden in der experimentellen Chemotherapie auch zwei F68-stabilisierte Doxorubicin-NP eingesetzt.

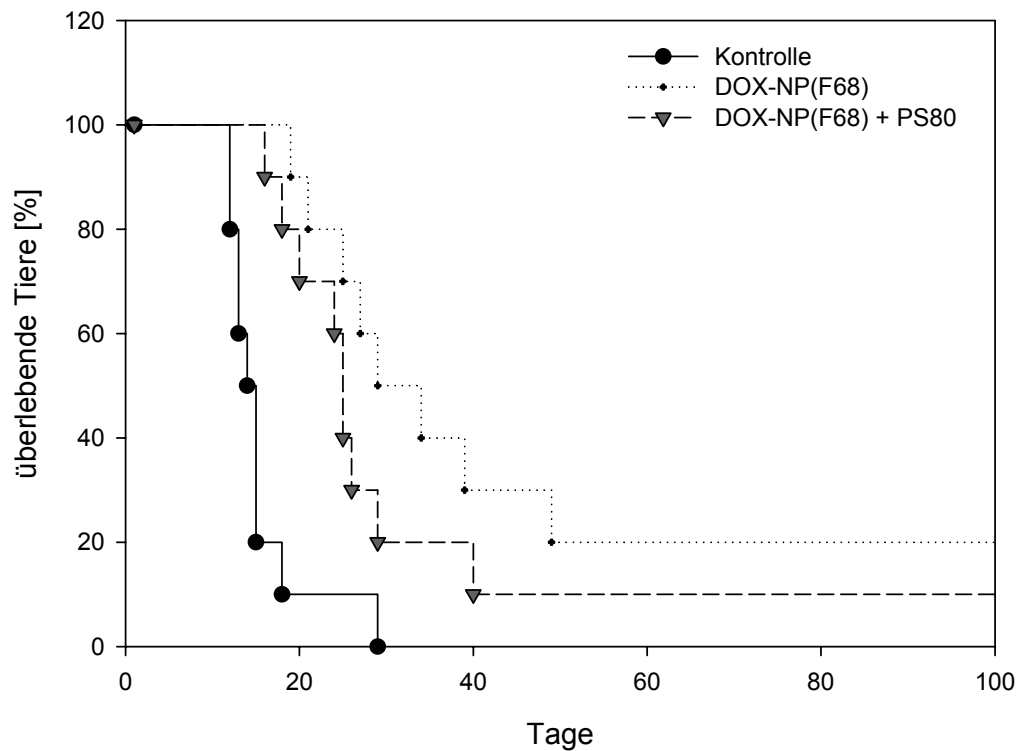


Abbildung 72 Kaplan-Meier Plot: Vergleich verschiedener Pluronic-stablisierter Doxorubicin-NP

Beide Zubereitungen zeigen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Verlängerung der Überlebenszeit. Die Wirkung der PS80-überzogenen Partikel liegt im Bereich der reinen Doxorubicin-Lösung (10 % Remission), wohingegen die ungecoateten F68-stabilisierten NP 20 % Remission zeigen.

Dies ist im Hinblick auf die signifikant schlechtere Arzneistoffbeladung der F68-stabilisierten NP ein erstaunliches Ergebnis (vgl. 4.6).

6.4 Adsorption von Plasmaproteinen an die Nanopartikeloberfläche

Die experimentelle Chemotherapie dieser Studie zeigte, dass Tensid-überzogene Doxorubicin-Nanopartikel einen stärkeren antitumoralen Effekt besitzen als Partikel, die unmodifiziert verwendet wurden. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Versuche (Gelperina 2000; Steiniger 2004). Die Tenside scheinen die Oberfläche der Partikel derart zu modifizieren, dass ein Transport der arzneistoffbeladenen NP oder des freien Arzneistoffs über die BHS ermöglicht wird. Wahrscheinlich bestimmen an der Partikeloberfläche adsorbierte Plasmaproteine aus dem Blut die Körperverteilung der applizierten Partikel (Blunk 1993). So wird vermutet, dass Polysorbat 80 überzogene PBCA-NP in erster Linie ApoA-I und ApoE an ihre Oberfläche anlagern. Dadurch ähneln diese Partikel in Bezug auf ihre Oberflächenstruktur den LDL-Partikeln und könnten über Lipoproteinrezeptoren der Endothelzellen an der BHS aufgenommen werden (Lück 1997).

Zwei der erfolgreichsten Nanopartikel-Formulierungen aus der Chemotherapie, Polysorbat 80- und Pluronic® F68-überzogene DOX-NP, wurden von Boris Petri (FU Berlin, AK Prof. R.H. Müller) mittels zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D PAGE) in Bezug auf ihre Plasmaproteinadsorption untersucht. Hierzu wurden die gefriergetrockneten Dextran-stabilisierten PBCA-Zubereitungen in einer 1 %igen Lösung von Polysorbat 80 bzw. Pluronic® F68 redispergiert und in Citrat-stabilisiertem Ratten-Plasma inkubiert. Die Partikel wurden nach der Inkubation durch Zentrifugation abgetrennt und mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die adsorbierten Proteine wurden mit Hilfe einer DTE- und SDS-enhaltenden Lösung desorbiert und mittels 2D PAGE aufgetrennt (Petri 2005). Die nachfolgende Abbildung gibt die Volumenanteile der adsorbierten Proteine wieder:

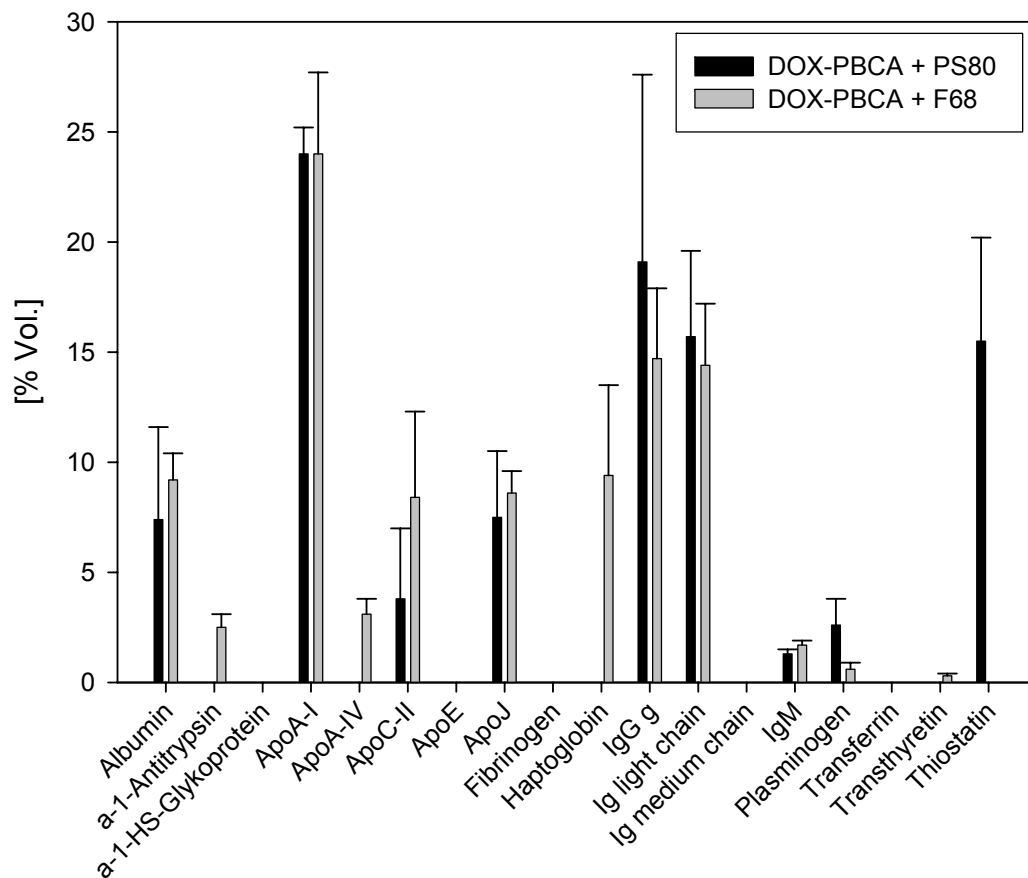


Abbildung 73 - Adsorption von Plasmaproteinen an gecoateten DOX-NP (n = 4), aus (Petri 2005)

Auffällig ist die große Übereinstimmung zwischen den beiden Zubereitungen in den adsorbierten Plasmaproteinen. Beide Tenside führen zur bevorzugten Anlagerung von Albumin, ApoA-I, ApoC-II, ApoJ, IgG und Ig light chain an die Oberfläche der arzneistoffbeladenen NP.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Lück lagern die hier untersuchten NP praktisch kein ApoE an ihrer Oberfläche an. In beiden Untersuchungen konnten große Anteile ApoA-I und ApoJ nachgewiesen werden. Eine Begründung für die fehlende Anlagerung von ApoE könnte sein, dass unterschiedliche Partikelsysteme untersucht wurden: Lück untersuchte die Plasmaproteinadsorption an leeren Partikel, wohingegen Petri die Adsorption an DOX-beladenen NP studierte.

6.5 Abschließende Bewertung

Alle Zubereitungen führten zu einer signifikanten Lebensverlängerung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Mit Ausnahme der Zubereitung „DOX-NP(Dex.)+ P85“ zeigten alle Zubereitungen eine vergleichbare oder stärkere antitumorale Wirkung als die reine Doxorubicin-Lösung. Sehr viel versprechende Ergebnisse wurden mit F68 als Coating-Tensid erzielt. Auch die Verwendung von F68-stabilisierten, ungecoateten DOX-NP führte zu ermutigenden Ergebnissen in der Chemotherapie.

Wie das Adsorptionsmuster der Plasmaproteine vermuten lässt, kann die gute Wirksamkeit der F68-Zubereitungen durch die Adsorption der Lipoproteine ApoA-I und ApoJ begründet werden. Auch der bisherige „Gold-Standard“ (DOX-NP + PS80) zeigt eine hohe Adsorption dieser Apolipoproteine.

ApoA-I findet sich in erster Linie in HDL-Partikeln, welche für den Transport von Cholesterol im Organismus verantwortlich sind. Es ist bekannt, dass der Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) eine hohe Bindungsaffinität zu ApoA-I besitzt (Xu 1997). Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor werden die HDL-Partikel nach Bindung an SR-BI jedoch nicht internalisiert, vielmehr scheinen nur die im HDL enthaltenen Cholesterol-Ester selektiv aufgenommen zu werden. Der Rezeptor würde somit nur als Andockstation für das „Cholesterol Shuttle HDL“ dienen. Bei SR-BI scheint es sich um einen relativ unselektiven Rezeptor zu handeln, da er auch andere Apolipoproteine wie etwa ApoA-II, ApoC-III, Apo-B bindet und eine Affinität zu LDL-Partikeln zeigt (Krieger 1999).

Aus diesen Überlegungen heraus erscheint es denkbar, dass die Tensid-gecoateten und Arzneistoff-beladenen Partikel über das an ihrer Oberfläche angelagerte ApoA-I ebenfalls an diesen Rezeptor binden und den Arzneistoff in hoher lokaler Konzentration freigeben. Der freigegebene Arzneistoff könnte sodann über passive Diffusion oder einen noch ungeklärten Mechanismus aufgenommen werden.

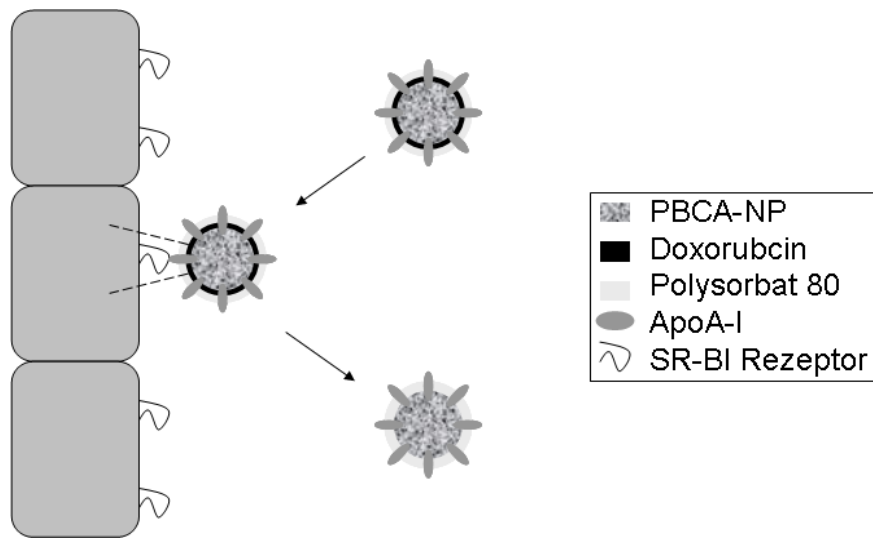


Abbildung 74 - Hypothetischer Aufnahmeweg von Doxorubicin in die Endothelzellen
nach ApoA-I-vermittelter Bindung der NP an den SR-BI Rezeptor

Die Untersuchung anderer Tensid-überzogener Doxorubicin-Nanopartikel mit Hilfe der 2D-PAGE könnte zur weiteren Aufklärung dieses vermuteten Aufnahmewegs führen. So sollten die unwirksamen Pluronic® P85-NP ein anderes Adsorptionsmuster zeigen als die wirksamen Zubereitungen, welche mit Polysorbat 80 und Pluronic® F68 überzogen sind.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Herstellung von Poly(butylcyanoacrylat)-Nanopartikeln (PBCA-NP) ist seit fast 25 Jahren bekannt. Sie erfolgt meist durch anionische Emulsionspolymerisation von Butylcyanoacrylat unter Verwendung von Dextran 70.000 als Stabilisator (Douglas 1984; Gulyaev 1999; Steiniger 2004). Vereinzelt wurde in früheren Arbeiten bereits Pluronic® F68 als Emulgator für die Polymerisationsreaktion verwendet (Kreuter 1984).

Diese Arbeit hat ihren Schwerpunkt in der Herstellung von PBCA-NP mit F68 als Stabilisator. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit diesem Hilfsstoff ebenfalls nanopartikuläre Trägersysteme reproduzierbar und im gewünschten Größenbereich um 200 nm herstellen lassen. Diese Partikel besitzen im Gegensatz zu Dextran-stabilisierten NP eine sehr enge Größenverteilung, was an einer Polydispersität $< 0,05$ zu erkennen ist. Ihre mittlere Größe und die Partikelausbeute sind mit der Größe und der Ausbeute von Dextran-stabilisierten Partikeln vergleichbar. Das Zetapotential leerer F68-stabilsierter NP ($-15,5 \pm 1,5 \text{ mV}$) ist signifikant negativer als das Zetapotential Dextran-stabilisierten NP ($-11,7 \pm 2,4 \text{ mV}$). Bei der Arzneistoffbeladung von Doxorubicin-PBCA-NP zeigen sich ebenfalls signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Hilfsstoff: Dextran-stabilisierte DOX-NP weisen mit 69 % eine deutlich höhere Beladung auf als die Pluronic-stabilisierten Systeme mit weniger als 35 %.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die hergestellten NP auch im Bezug auf ihr Molekulargewicht und ihre Dichte charakterisiert. Ein Partikel besitzt die Masse von ca. $2,5 \cdot 10^9$ Dalton und hat eine Dichte von etwa $1,148 \text{ g/cm}^3$. Bei einem PBCA-Nanopartikel handelt es sich jedoch nicht um ein Riesenmolekül, vielmehr wird er durch Agglomeration von relativ kurzen Polymerketten gebildet. Ein Partikel besteht aus ca. einer Million Polymerketten, welche ein Molekulargewicht von ca. 2500 g/mol besitzen.

Der Einfluss der Herstellungsparameter auf leere und arzneistoffbeladene Partikel wurde untersucht. Die Partikel wurden hierbei durch die Parameter Partikelgröße, Polydispersität, Partikelausbeute, Zetapotential und Molekulargewicht charakterisiert. Leere Partikel lassen sich unter Verwendung von Pluronic® F68 als Stabilisator gut reproduzierbar bei pH 2, einem Volumen von 20 ml und einer Polymerisationszeit von 4 Stunden herstellen. Die Neutralisation kann durch Zugabe von Natronlauge oder Phosphat-Puffer erfolgen. Allerdings sind auch Modifikationen dieses Protokolls möglich, ohne die Ausbildung der Nanopartikel zu stören. So ist zum Beispiel die Herstellung von größeren Volumina oder bei leicht verändertem pH problemlos möglich.

Neben der Herstellung durch anionische Emulsionspolymerisation wurden NP durch radikalische Emulsionspolymerisation und Nanopräzipitation erhalten. Auch unter Verwendung dieser Verfahren wurden Trägersysteme im gewohnten Größenbereich um 200 nm gebildet. Während die Anwendung von NP, welche auf dem Wege der radikalischen Polymerisation gewonnen wurden, aufgrund der Anzahl und Menge an zum Teil toxischen Hilfsstoffen als eher problematisch einzustufen ist, könnte die Herstellung von NP durch Präzipitation des vorgebildeten Polymers neue Möglichkeiten in der Herstellung von arzneistoffbeladenen Partikeln bieten. Durch dieses Verfahren wäre es unter anderem möglich, Arzneistoffe zu verarbeiten, welche mit den sauren Reaktionsbedingungen der Emulsionspolymerisation unverträglich sind, die Polymerisationsreaktion stören oder eine zu geringe Wasserlöslichkeit besitzen.

Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass die Herstellung von sicher fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln mit einer PBCA-Grundstruktur bis dato nicht gelungen ist. Die in dieser Arbeit vorgestellten Systeme lassen sich reproduzierbar und unter geringem Aufwand herstellen, bieten jedoch durchweg keine sichere Markierung des Trägersystems. Auch in der Literatur ist bisher keine überzeugende Markierung für PACA-NP gezeigt worden. Alle bisher verwendeten Label besitzen ihre jeweils spezifischen Nachteile.

Lediglich durch die kovalente Bindung des fluoreszierenden Labels ist eine eindeutige Markierung der Trägersysteme möglich. Im Rahmen der Diskussion konnten realisierbare, kovalente Markierungen vorgestellt werden, deren praktische Umsetzung im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht mehr erfolgen konnte.

Zusätzlich zur Herstellung von NP hat sich diese Arbeit auch mit den Charakterisierungsmethoden für kleinpartikuläre Arzneiformen auseinandergesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die häufig angewendete dynamische Lichtstreuung ein geeignetes Verfahren zur Ermittlung des mittleren Partikeldurchmessers darstellt. Die Ergebnisse dieser Methode stimmen weitgehend mit den Resultaten der zusätzlich verwendeten mikroskopischen Verfahren und der analytischen Ultrazentrifugation überein. Die verwendeten mikroskopischen Verfahren, Transmissions-Elektronenmikroskopie, Raster-Elektronenmikroskopie und Raster-Kraft-Mikroskopie lieferten ansprechende Bilder von nahezu perfekt sphärischen Nanopartikeln mit einheitlicher Größe. Der Einsatz der analytischen Ultrazentrifugation lieferte die best aufgelöste Partikelgrößenverteilung und ermöglichte darüber hinaus die Bestimmung der Dichte der Partikel. Die Größe der gebildeten Systeme wurde somit durch fünf verschiedene Verfahren, welche auf drei unterschiedliche Theorien zurückgehen, bestimmt. Es konnte kein gravierender Unterschied festgestellt werden. Die routinemäßige Größenbestimmung der gebildeten Partikel kann daher bedenkenlos mittels DLS erfolgen.

Neben der mittleren Größe der Trägersysteme wurde auch das mittlere Molekulargewicht der gebildeten Polymerketten bestimmt. Die hierfür als Standard eingesetzte Gel-Permeations-Chromatographie wurde mit einem relativ neuen Verfahren, der MALDI-TOF Massenspektrometrie verglichen. Beide Verfahren lieferten ein zahlenmittleres Molekulargewicht der Polymerketten von 2500 – 3000 Da. Lediglich im Bezug auf das gewichtsmittlere Molekulargewicht zeigten sich größere Unterschiede zwischen beiden Messverfahren, welche jedoch auf das zugrunde liegende Messprinzip und nicht auf das untersuchte PBCA zurückzuführen sind.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte die chemische Struktur der Polymerketten näher aufgeklärt werden. Neben den Produkten des seit langem postulierten Reaktionsmechanismus finden sich Derivate des Polymers, welche formal durch Abspaltung bzw. Anlagerung von Formaldehyd entstehen. Die Menge an frei vorliegendem Formaldehyd scheint jedoch so gering zu sein, dass sie kaum die Hauptursache für die relative Toxizität der PACA-NP darstellen kann. Darüber hinaus ist es möglich, durch Wahl der Reaktionsbedingungen die Bildung von Derivaten des Ursprungspolymers und von Formaldehyd zu minimieren.

Die Ergebnisse in der Herstellung und Charakterisierung von leeren Pluronic® F68-stabilisierten PBCA-NP ließen die Verwendung von Doxorubicin-beladenen NP unter Verwendung dieses Stabilisators für die Gehirntumor-Therapie viel versprechend erscheinen. Zusätzlich sprach für den Einsatz dieses Tensids, dass in einer anderen Arbeit eine erhöhte ZNS-Gängigkeit von nanopartikulären Trägersystemen mit F68 gezeigt werden konnte (Yang 1999).

Die hergestellten Nanopartikel zeigten eine im Vergleich zu Dextran-stabilisierten Doxorubicin-NP signifikant niedrigere Arzneistoffbeladung. Die dessen ungeachtet durchgeführte experimentelle Chemotherapie an Glioblastom-tragenden Ratten lieferte jedoch ermutigende Ergebnisse. Die neu entwickelte Zubereitung führte zu einem vergleichbaren Prozentsatz an Remissionen wie die bisherige Standard-PBCA-Formulierung.

Die F68-stabilisierte Formulierung und die bisherige Standard-Formulierung mit Polysorbat 80 zeigten nach Inkubation mit humanem Plasma ein vergleichbares Adsorptionsmuster an Plasmaproteinen. Möglicherweise kommt es in vivo nach intravenöser Applikation des Trägersystems zu einer Adsorption von ApoA-I an dessen Oberfläche und so zu einer Bindung der NP an den Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) an den Endothelzellen. Infolge dessen könnte es zur Freisetzung und Aufnahme des Arzneistoffs kommen, wie es auch für ApoA-I-reiche HDL-Partikel und Cholesterol-Ester beschrieben ist (Krieger 1999).

Auf Basis der vorangegangenen Studien und dieser Arbeit erscheint es möglich, eine potente nanopartikuläre Doxorubicin-Zubereitung zu entwickeln, welche ausreichend charakterisiert ist, um ihre Anwendung am Menschen zu vertreten.

8 LITERATUR

- Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E. (1993). "Drug-loaded nanoparticles - Preparation methods and drug targeting issues". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **39** (5): 173-191.
- Allemann, E., Brasseur, N., Benrezzak, O., Rousseau, J., Kudrevich, S. V., Boyle, R. W., Leroux, J. C., Gurny, R., Van Lier, J. E. (1995). "Peg-coated poly(lactic acid) nanoparticles for the delivery of hexadecafluoro zinc phthalocyanine to EMT-6 mouse mammary tumours". *J. Pharm. Pharmacol.* **47** (5): 382-387.
- Alyaudtin, R. N., Gothier, D., Petrov, V., Kharkevich, D. A., Kreuter, J. (1995). "Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **41** (1): 44-48.
- Alyaudtin, R. N., Tezikov, E. B., Range, P., Kharkevich, D. A., Begley, D., Kreuter, J. (1998). "Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: An in situ brain perfusion study". *J. Microencapsul.* **15** (1): 67-74.
- Alyaudtin, R. N., Petrov, V. E., Langer, K., Berthold, A., Kharkevich, D. A., Kreuter, J. (1997). "Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles". *Pharm. Res.* **14** (3): 325-328.
- Anderson, J. M., Shive, M. S. (1997). "Biodegradation and biocompatibility of pla and plga microspheres". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **28** (1): 5-24.
- Araujo, L., Löbenberg, R., Kreuter, J. (1999). "Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles." *J. Drug Target.* **6** (5): 373-385.
- Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001). "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (1-3): 27-43.
- Balthasar, S., Michaelis, K., Dinauer, N., Von Briesen, H., Kreuter, J., Langer, K. (2005). "Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes". *Biomaterials* **26** (15): 2723-2732.
- Batrakova, E. V., Han, H. Y., Alakhov, V., Miller, D. W., Kabanov, A. V. (1998). "Effects of Pluronic block copolymers on drug absorption in Caco-2 cell monolayers". *Pharm. Res.* **15** (6): 850-855.
- Batrakova, E. V., Li, S., Vinogradov, S. V., Alakhov, V. Y., Miller, D. W., Kabanov, A. V. (2001a). "Mechanism of Pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: Contributions of energy depletion and membrane fluidization". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299** (2): 483-493.
- Batrakova, E. V., Miller, D. W., Li, S., Alakhov, V. Y., Kabanov, A. V., Elmquist, W. F. (2001b). "Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: In vitro and in vivo studies". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296** (2): 551-557.
- Begley, D. J. (2004). "Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: The problems and the possibilities". *Pharmacol. Ther.* **104** (1): 29-45.
- Behan, N., Birkinshaw, C., Clarke, N. (2001). "Poly n-butylcyanoacrylate nanoparticles: A mechanistic study of polymerisation and particle formation". *Biomaterials* **22** (11): 1335-1344.

-
- Bennis, S., Chapey, C., Couvreur, P., Robert, J. (1994). "Enhanced cytotoxicity of doxorubicin encapsulated in polyisohexylcyanoacrylate nanospheres against multidrug-resistant tumour cells in culture". *Eur. J. Cancer* **30A** (1): 89-93.
- Bentele, V., Berg, U. E., Kreuter, J. (1983). "Molecular weights of poly(methyl methacrylate) nanoparticles". *Int. J. Pharm.* 109-113.
- Bingaman, S., Huxley, V. H., Rumbaut, R. E. (2003). "Fluorescent dyes modify properties of proteins used in microvascular research". *Microcirculation* **10** (2): 221-231.
- Blunk, T., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C., Müller, B. W., Müller, R. H. (1993). "Colloidal carriers for intravenous drug targeting: Plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis". *Electrophoresis* **14** (12): 1382-1387.
- Borchard, G., Audus, K. L., Shi, F., Kreuter, J. (1994). "Uptake of surfactant-coated poly(methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers". *Int. J. Pharm.* **110** 29-35.
- Brigger, I., Morizet, J., Laudani, L., Aubert, G., Appel, M., Velasco, V., Terrier-Lacombe, M. J., Desmaele, D., D'angelo, J., Couvreur, P., Vassal, G. (2004). "Negative preclinical results with stealth(R) nanospheres-encapsulated doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model". *J. Control. Release* **100** (1): 29-40.
- Cerletti, A., Drewe, J., Fricker, G., Eberle, A. N., Huwyler, J. (2000). "Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system." *J. Drug Target.* **8** (6): 435-446.
- Chauvierre, C., Labarre, D., Couvreur, P., Vauthier, C. (2002). "Radical polymerization of alkylcyanoacrylates to produce polysaccharide-coated nanoparticles". *Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, Florence, 8/11 April 2002* 665-666.
- Coester, C., Kreuter, J., Von Briesen, H., Langer, K. (2000). "Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA)". *Int. J. Pharm.* **196** (2): 147-149.
- Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., Speiser, P. (1979). "Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: Preparation, morphological and sorptive properties". *J. Pharm. Pharmacol.* **31** (5): 331-332.
- Couvreur, P., Kante, B., Grislain, L., Roland, M., Speiser, P. (1982). "Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles". *J. Pharm. Sci.* **71** (7): 790-792.
- Damascelli, B., Cantu, G., Mattavelli, F., Tamplenizza, P., Bidoli, P., Leo, E., Dosio, F., Cerrotta, A. M., Di Tolla, G., Frigerio, L. F., Garbagnati, F., Lanocita, R., Marchiano, A., Patelli, G., Spreafico, C., Ticha, V., Vespro, V., Zunino, F. (2001). "Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: Preliminary evidence of clinical activity". *Cancer* **92** (10): 2592-2602.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., Traganos, F. (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry". *Cytometry* **13** (8): 795-808.
- De Boer, A. G., Van Der Sandt, I. C., Gaillard, P. J. (2003). "The role of drug transporters at the blood-brain barrier". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43** 629-656.
- Desai, E. A. (1999). "Protein stabilized pharmacologically active agents, methods for the preparation thereof and methods for the use thereof". (US Patent Nr. 6,749,868).
- Desai, E. A. (2004). "Paclitaxel-containing formulations". (US Patent Nr. 6,753,006).
-

- Diederichs, J. E., Müller, R. H. (1998). "Future strategies for drug delivery with particulate systems". medpharm.
- Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M., Kataoka, Y. (2005). "Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production". *Brain Res.* **1038** (2): 208-215.
- Douglas, S. J., Illum, L., Davis, S. S., Kreuter, J. (1984). "Particle size and size distribution of poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles". *Journal of Colloidal and Interface Science* **101** (1): 149-158.
- Douglas, S. J., Illum, L., Davis, S. S. (1985). "Particle size and size distribution of poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. II. Influence of stabilizers". *J. Colloid Int. Sci.* **103** (1): 154-163.
- Eldem, T., Speiser, P., Hincal, A. (1991). "Optimization of spray-dried and -congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy". *Pharm. Res.* **8** (1): 47-54.
- El-Egakey, M. A., Bentele, V., Kreuter, J. (1983). "Molecular weights of polycyanoacrylate nanoparticles". *Int. J. Pharm.* **13** 349-352.
- Essex-Pharma (2005). "Fachinformation Caelyx".
- Friese, A., Seiller, E., Quack, G., Lorenz, B., Kreuter, J. (2000). "Increase of the duration of the anticonvulsive activity of a novel NMDA receptor antagonist using poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles as a parenteral controlled release system". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **49** (2): 103-109.
- Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Kim, H. R., Doan, T. L., Desmaele, D., D'angelo, J., Taran, F., Georgin, D., Couvreur, P. (2005). "A methodology to study intracellular distribution of nanoparticles in brain endothelial cells". *Int. J. Pharm.* **298** (2): 310-314.
- Gelperina, S. E., Smirnova, Z. S., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Bobruskin, A. I., Kreuter, J. (2000). "Chemotherapy of brain tumours using doxorubicin bound to polysorbate 80-coated nanoparticles". *Proc. 3rd World Meeting APV/APGI, Berlin, 3/6 April 2000* 441-443.
- Gelperina, S. E., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Smirnova, Z. S., Bobruskin, A. I., Severin, S. E., Turowski, B., Zanella, F. E., Kreuter, J. (2002). "Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma". *Toxicol. Lett.* **126** (2): 131-141.
- Gherzi-Egea, J. F., Leninger-Muller, B., Suleman, G., Siest, G., Minn, A. (1994). "Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs". *J. Neurochem.* **62** (3): 1089-1096.
- Grislain, L., Couvreur, P., Lenaerts, V., Roland, M., Deprez-Decampeneere, D., Speiser, P. (1983). "Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier". *Int. J. Pharm.* **15** (3): 335-345.
- Gulyaev, A. E., Gelperina, S. E., Skidan, I. N., Antropov, A. S., Kivman, G. Y., Kreuter, J. (1999). "Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles". *Pharm. Res.* **16** (10): 1564-1569.
- Haggerty, L., Lenhoff, A. M. (1993). "STM and AFM in biotechnology". *Biotechnol. Prog.* **9** (1): 1-11.

- Hau, P., Fabel, K., Baumgart, U., Rummele, P., Grauer, O., Bock, A., Dietmaier, C., Dietmaier, W., Dietrich, J., Dudel, C., Hubner, F., Jauch, T., Drechsel, E., Kleiter, I., Wismeth, C., Zellner, A., Brawanski, A., Steinbrecher, A., Marienhagen, J., Bogdahn, U. (2004). "Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma". *Cancer* **100** (6): 1199-1207.
- Henriques, C., De Souza, W. (2000). "Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the leishmania amazonensis-containing parasitophorous vacuole". *Parasitol. Res.* **86** (3): 215-225.
- Joseph, S., Olbrich, C., Kirsch, J., Hasbach, M., Briel, A., Schirner, M. (2004). "A real-time in vitro assay for studying functional characteristics of target-specific ultrasound contrast agents". *Pharm. Res.* **21** (6): 920-926.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., Alakhov, V. Y. (2002). "Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** (5): 759-779.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., Yu Alakhov, V. (2003). "An essential relationship between ATP depletion and chemosensitizing activity of Pluronic(R) block copolymers". *J. Control. Release* **91** (1-2): 75-83.
- Kante, B., Couvreur, P., Dubois-Krack, G., De Meester, C., Guiot, P., Roland, M., Mercier, M., Speiser, P. (1982). "Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles I: Free nanoparticles". *J. Pharm. Sci.* **71** (7): 786-790.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F. (1987). "Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds". *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78** 53-68.
- Kemper, E. M., Boogerd, W., Thuis, I., Beijnen, J. H., Van Tellingen, O. (2004). "Modulation of the blood-brain barrier in oncology: Therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours?" *Cancer Treat. Rev.* **30** (5): 415-423.
- Kleihues, P., Cavenee, W. K. (2000). "WHO classification of tumours". Lyon, IARC.
- Kreuter, J., Speiser, P. P. (1976). "New adjuvants on a polymethylmethacrylate base". *Infect. Immun.* **13** (1): 204-210.
- Kreuter, J. (1978). "Nanoparticles and nanocapsules--new dosage forms in the nanometer size range". *Pharm. Acta Helv.* **53** (2): 33-39.
- Kreuter, J. (1983). "Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. I: Preparation methods". *Pharm. Acta Helv.* **58** (7): 196-209.
- Kreuter, J., Wilson, C. G., Fry, J. R., Paterson, P., Ratcliffe, J. H. (1984). "Toxicity and association of polycyanoacrylate nanoparticles with hepatocytes". *J. Microencapsul.* **1** (3): 253-257.
- Kreuter, J. (1994). "Nanoparticles" in "Encyclopedia of pharmaceutical technology". New York, Marcel Dekker. **10**: 165-190.
- Kreuter, J., Alyautdin, R. N., Kharkevich, D. A., Ivanov, A. A. (1995). "Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles)". *Brain Res.* **674** (1): 171-174.
- Kreuter, J. (2001). "Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47** (1): 65-81.
- Kreuter, J. (2002). "Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles". *Curr. Med. Chem.* **2** (3): 241-249.

- Krieger, M. (1999). "Charting the fate of the "good cholesterol": Identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI". *Annu. Rev. Biochem.* **68** 523-558.
- Lamprecht, A. (2002). "Universalwerkzeug für die Arzneimittelentwicklung". *Pharmazeutische Zeitung* (4): 236-241.
- Langer, K., Coester, C., Weber, C., Von Briesen, H., Kreuter, J. (2000). "Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **49** (3): 303-307.
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., Von Briesen, H., Schubert, D. (2003). "Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles". *Int. J. Pharm.* **257** (1-2): 169-180.
- Leonard, F., Kulkarni, R. K., Brandes, G., Nelson, J., Cameron, J. J. (1966). "Synthesis and degradation of poly (alkyl alpha-cyanoacrylates)". *J. Appl. Polym. Sci.* **10** (2): 259-272.
- Lesniak, M. S., Brem, H. (2004). "Targeted therapy for brain tumours". *Nat. Rev. Drug Discov.* **3** (6): 499-508.
- Letourneur, D., Logeart, D., Avramoglou, T., Jozefonvicz, J. (1993). "Antiproliferative capacity of synthetic dextrans on smooth muscle cell growth: The model of derivatized dextrans as heparin-like polymers". *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **4** (5): 431-444.
- Li, H., Marotta, D. E., Kim, S., Busch, T. M., Wileyto, E. P., Zheng, G. (2005). "High payload delivery of optical imaging and photodynamic therapy agents to tumors using phthalocyanine-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles". *J. Biomed. Opt.* **10** (4): 41203.
- Lo, Y. L. (2003). "Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in caco-2 cells and rat intestines". *J. Control. Release* **90** (1): 37-48.
- Löbenberg, R., Kreuter, J. (1996). "Macrophage targeting of azidothymidine: A promising strategy for AIDS therapy". *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12** (18): 1709-1715.
- Lou, X., Van Dongen, J. L., Meijer, E. W. (2000). "Off-line size-exclusion chromatographic fractionation-matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for polymer characterization. Theoretical and experimental study". *J. Chromatogr. A* **896** (1-2): 19-30.
- Lück, M. (1997). Dissertation "Plasmaproteinadsorption als möglicher Schlüsselfaktor für eine kontrollierte Arzneistoffapplikation mit partikulärenträgern". *Institut für Pharmazie*. Berlin, Freie Universität Berlin.
- Lucks, S., Müller, R. H. (1992). "Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen (feste Lipidnanosphären (SLN))". (Patent Nr. EP 0605497 B1).
- Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., Fernandes, J. C. (2004). "Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57** (1): 1-8.
- Marty, J. J., Oppenheim, R. C., Speiser, P. (1978). "Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system". *Pharm. Acta Helv.* **53** (1): 17-23.
- Matsumura, Y., Maeda, H. (1986). "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs". *Cancer Res.* **46** (12 Pt 1): 6387-6392.

-
- Mehnert, W., Mader, K. (2001). "Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47** (2-3): 165-196.
- Miller, G. (2002). "Drug targeting. Breaking down barriers". *Science* **297** (5584): 1116-1118.
- Misra, A., Ganesh, S., Shahiwala, A., Shah, S. P. (2003). "Drug delivery to the central nervous system: A review". *J. Pharm. Pharm. Sci.* **6** (2): 252-273.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M. (2001). "Arzneimittelwirkungen". Wissenschaftliche Verlagsges.
- Nash, T. (1953). "The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction". *Biochem. J.* **55** 416-421.
- Nicolaisen, C. (2005). Sichelwerke, Hannover. persönlicher Kontakt.
- Nonier, M. F., Absalon, C., Vivas, N., Vivas De Gaulejac, N. (2004). "Application of off-line size-exclusion chromatographic fractionation-matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for proanthocyanidin characterization". *J. Chromatogr. A* **1033** (2): 291-297.
- Olbrich, C. (2005). Schering AG, Berlin. persönlicher Kontakt.
- Oldendorf, W. H., Hyman, S., Braun, L., Oldendorf, S. Z. (1972). "Blood-brain barrier: Penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection". *Science* **178** (64): 984-986.
- Olivier, J. C., Fenart, L., Chauvet, R., Pariat, C., Cecchelli, R., Couet, W. (1999). "Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity". *Pharm. Res.* **16** (12): 1836-1842.
- Olivier, J. C. (2005). "Drug transport to brain with targeted nanoparticles". *NeuroRx* **2** (1): 108-119.
- Paddock, S. W. (1999). "Confocal laser scanning microscopy". *Biotechniques* **27** (5): 992-996, 998-1002, 1004.
- Pardridge, W. M. (1998). "CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport". *J. Neurochem.* **70** (5): 1781-1792.
- Pardridge, W. M. (1999). "Blood-brain barrier biology and methodology". *J. Neurovirol.* **5** (6): 556-569.
- Pardridge, W. M. (2002). "Drug and gene targeting to the brain with molecular trojan horses". *Nat. Rev. Drug Discov.* **1** (2): 131-139.
- Pardridge, W. M. (2005). "The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development". *NeuroRx* **2** (1): 3-14.
- Pasch, H., Gores, F. (1995). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of synthetic polymers: 2. Analysis of poly(methyl methacrylate)". *Polymer* **36** (10): 1999-2005.
- Peracchia, M. T., Desmaele, D., Couvreur, P., D'angelo, J. (1997a). "Synthesis of a novel poly(mepeg cyanoacrylate-co-alkyl cyanoacrylate) amphiphilic copolymer for nanoparticle technology". *Macromolecules* **30** 846-851.
- Peracchia, M. T., Vauthier, C., Puisieux, F., Couvreur, P. (1997b). "Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol)". *J. Biomed. Mater. Res.* **34** (3): 317-326.
-

- Peracchia, M. T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J. P., Gomis, J. M., Appel, M., D'angelo, J., Couvreur, P. (1999). "Stealth pegylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting". *J. Control. Release* **60** (1): 121-128.
- Petri, B. (2006). Dissertation *Institut für Pharmazie*. Berlin, Freie Universität.
- Pharmacia (2004). "Fachinformation Adriblastin".
- Pierce "Remove of detergent from protein samples". *Technical Resource* 1-2.
- Pietzonka, P., Rothen-Rutishauser, B., Langguth, P., Wunderli-Allenspach, H., Walter, E., Merkle, H. P. (2002). "Transfer of lipophilic markers from PLGA and polystyrene nanoparticles to caco-2 monolayers mimics particle uptake". *Pharm. Res.* **19** (5): 595-601.
- Ramge, P., Unger, R. E., Oltrogge, J. B., Zenker, D., Begley, D., Kreuter, J., Von Briesen, H. (2000). "Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells". *Eur. J. Neurosci.* **12** (6): 1931-1940.
- Rapoport, S. I. (2000). "Osmotic opening of the blood-brain barrier: Principles, mechanism, and therapeutic applications". *Cell Mol. Neurobiol.* **20** (2): 217-230.
- Reddy, L. H., Murthy, R. R. (2004a). "Influence of polymerization technique and experimental variables on the particle properties and release kinetics of methotrexate from poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles". *Acta Pharm.* **54** (2): 103-118.
- Reddy, L. H., Murthy, R. S. (2004b). "Pharmacokinetics and biodistribution studies of doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques". *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub.* **148** (2): 161-166.
- Rittierodt, M., Harada, K. (2003). "Repetitive doxorubicin treatment of glioblastoma enhances the Pgp expression--a special role for endothelial cells". *Exp. Toxicol. Pathol.* **55** (1): 39-44.
- Roderfeld, M., Matern, S., Roeb, E. (2003). "Konfokale Laserscanning-Mikroskopie: Der Blick in die Zelle." *Dtsch. Med. Wochenschr.* **128** (48): 2539-2542.
- Sackett, D. L., Wolff, J. (1987). "Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces". *Anal. Biochem.* **167** (2): 228-234.
- Schäfer, V., Von Briesen, H., Rubsamen-Waigmann, H., Steffan, A. M., Royer, C., Kreuter, J. (1994). "Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages". *J. Microencapsul.* **11** (3): 261-269.
- Schnyder, A., Huwyler, J. (2005). "Drug transport to brain with targeted liposomes". *NeuroRx* **2** (1): 99-107.
- Schröder, U., Sommerfeld, P., Ulrich, S., Sabel, B. A. (1998). "Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier". *J. Pharm. Sci.* **87** (11): 1305-1307.
- Schwedat, A. (2006). Dissertation *Institut für pharmazeutische Technologie*. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe Universität.
- Sibata, C. H., Colussi, V. C., Oleinick, N. L., Kinsella, T. J. (2001). "Photodynamic therapy in oncology". *Expert Opin. Pharmacother.* **2** (6): 917-927.
- Sigma-Aldrich "Detergents properties and applications" *Data Sheet*.

-
- Soma, C. E., Dubernet, C., Bentolila, D., Benita, S., Couvreur, P. (2000). "Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin a in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles". *Biomaterials* **21** (1): 1-7.
- Sommerfeld, P., Sabel, B. A., Schroeder, U. (2000). "Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions". *J. Microencapsul.* **17** (1): 69-79.
- Spickermann, J., Martin, K., Räder, H. J., Müllen, K., Schlaad, H., Müller, A. H. E., Kruger, R.-P. (1996). "Quantitative analysis of broad molecular weight distributions obtained by matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry". *Eur. J. Mass Spectrom.* **2** 161 - 165.
- Steiniger, S. C., Kreuter, J., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Bobruskin, A. I., Smirnova, Z. S., Severin, S. E., Uhl, R., Kock, M., Geiger, K. D., Gelperina, S. E. (2004). "Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles". *Int. J. Cancer* **109** (5): 759-767.
- Suh, H., Jeong, B., Liu, F., Kim, S. W. (1998). "Cellular uptake study of biodegradable nanoparticles in vascular smooth muscle cells". *Pharm. Res.* **15** (9): 1495-1498.
- Tamai, I., Tsuji, A. (2000). "Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier". *J. Pharm. Sci.* **89** (11): 1371-1388.
- Terasaki, T., Hosoya, K. (1999). "The blood-brain barrier efflux transporters as a detoxifying system for the brain". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36** (2-3): 195-209.
- Torchilin, V. P. (2005). "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers". *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2): 145-160.
- Tröster, S. D., Müller, U., Kreuter, J. (1990). "Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants". *Int. J. Pharm.* **61** 85-100.
- Tseng, Y. C., Tabata, Y., Hyon, S. H., Ikada, Y. (1990). "In vitro toxicity test of 2-cyanoacrylate polymers by cell culture method". *J. Biomed. Mater. Res.* **24** (10): 1355-1367.
- Tsuji, A. (2005). "Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems". *NeuroRx* **2** (1): 54-62.
- Van De Waterbeemd, H. (2005). "Which in vitro screens guide the prediction of oral absorption and volume of distribution?" *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **96** (3): 162-166.
- Vansnick, L., Couvreur, P., Christiaens-Leyth, D., Roland, M. (1984). "Molecular weights of free and drug-loaded nanoparticles". *Pharm. Res.* 36-41.
- Vauthier, C., Schmidt, C., Couvreur, P. (1999). "Measurement of the density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation". *J. Nanop. Res.* **1** 411-418.
- Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H., Couvreur, P. (2003). "Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55** (4): 519-548.
- Visser, C. C., Stevanovic, S., Voorwinden, L. H., Bloois, L., Gaillard, P. J., Danhof, M., Crommelin, D. J., Boer, A. G. (2005). "Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier in vitro". *Eur. J. Pharm. Sci.* **25** (2-3): 299-305.
- Vogel, V., Langer, K., Balthasar, S., Schuck, P., Mächtle, W., Haase, W., Van Den Broek, J. A., Tziatzios, C., Schubert, D. (2002). "Characterization of serum albumin nanoparticles by sedimentation velocity analysis and electron microscopy". *Progr. Colloid. Polym. Sci.* **119** 31-36.
-

- Voigt, R., Fahr, A. (2000). "Pharmazeutische Technologie. Für Studium und Beruf". Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag.
- Wagner, J. (1986). "Teilchengrößen-Bestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung". *Chem.-Ing.-Tech.* **58** (7): 578-583.
- Walter, K. A., Tamargo, R. J., Olivi, A., Burger, P. C., Brem, H. (1995). "Intratumoral chemotherapy". *Neurosurgery* **37** (6): 1128-1145.
- Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., Langer, K. (2004). "Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells". *J. Drug Target.* **12** (7): 461-471.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Georgens, C., Rais, I., Kreuter, J., Karas, M., Wolkenhauer, M., Zimmer, A. (2004). "Physicochemical characterisation of cationic polybutylcyanoacrylate-nanoparticles by fluorescence correlation spectroscopy". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58** (1): 25-35.
- Wissing, S. A., Kayser, O., Müller, R. H. (2004). "Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56** (9): 1257-1272.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E. M., Ocalan, M., Farrell, C., Risau, W. (1994). "Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes". *J. Cell Sci.* **107** (Pt 5) 1347-1357.
- Wolburg, H., Lippoldt, A. (2002). "Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation". *Vascul. Pharmacol.* **38** (6): 323-337.
- Xu, S., Laccotripe, M., Huang, X., Rigotti, A., Zannis, V. I., Krieger, M. (1997). "Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake". *J. Lipid Res.* **38** (7): 1289-1298.
- Yang, S. C., Lu, L. F., Cai, Y., Zhu, J. B., Liang, B. W., Yang, C. Z. (1999). "Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain". *J. Control. Release* **59** (3): 299-307.
- Yoshikawa, T., Pardridge, W. M. (1992). "Biotin delivery to brain with a covalent conjugate of avidin and a monoclonal antibody to the transferrin receptor". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263** (2): 897-903.
- Zimmer, A., Kreuter, J., Robinson, J. R. (1991). "Studies on the transport pathway of PBCA nanoparticles in ocular tissues". *J. Microencapsul.* **8** (4): 497-504.

9 LEBENSLAUF

Name: Alexander Bootz

Anschrift: Juiststraße 31
45665 Recklinghausen
Alexander.Bootz@web.de



geboren: am 12.06.1976 in Münster (Westfalen)

Schul- / Hochschulausbildung

1982 – 1986	Grundschule an der Nordseestraße, Recklinghausen
1986 – 1995	Gymnasium Petrinum, Abitur
1995 – 2000	Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
11/2000 – 04/2001	Pharmaziepraktikant bei der Firma Tropon, Köln
05/2001 – 10/2001	Pharmaziepraktikant in der Birken-Apotheke, Köln
12/2001	Pharmazeutisches Staatsexamen und Approbation als Apotheker

wissenschaftliche Laufbahn:

01/2002 – 03/2006	Anfertigung einer Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Kreuter, Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
02/2002 – 03/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am obigen Institut, Betreuung der Studenten-Praktika „Salben, Suspensionen, Emulsionen“ und „Rektale und vaginale Zubereitungen“

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren: H. Blume, T. Dingermann, J. Dressman, E. Ehlers, K. Hainer, H. Hoffmann, J. Kreuter, G. Lambrecht, H. Linde, W.E. Müller, C.R. Noe, G. Schmalzing, D. Steinhilber, O. Werz und A. Zimmer

10 PUBLIKATIONEN

10.1 Artikel

Bootz, A., V. Vogel, D. Schubert and J. Kreuter (2004). "Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**: 369-375.

Bootz, A., T. Russ, F. Gores, M. Karas and J. Kreuter (2005). "Molecular weights of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles determined by mass spectrometry and size exclusion chromatography." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**(3): 391-399.

10.2 Posterpräsentationen / Abstracts

Bootz, A., V. Vogel, D. Schubert and J. Kreuter (2004). "Studies on the size of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles by scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation." International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg, 15-18 März 2004

Gelperina, S. E., A. S. Khalansky, I. N. Skidan, S. Steiniger, A. Bootz, S. E. Severin, Z. S. Smirnova, D. Begley and J. Kreuter (2004). "Doxorubicin Bound to Surface-Coated Poly(butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles for the Treatment of Brain Tumours." International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg, 15-18 März 2004

Bootz, A., M. Kappl, H.-J. Butt and J. Kreuter (2004). "AFM-Imaging of Poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles." Annual Meeting CRS Local Chapter Germany, Heidelberg, 2. April 2004

Bootz, A., T. Russ, M. Karas and J. Kreuter (2005). "Molecular weights of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles determined by mass spectrometry." 32nd Annual Meeting Controlled Released Society, Miami, 18-22 Juni 2005

Bootz, A., T. Hekmatara and S. E. Gelperina (2006). "Doxorubicin loaded Poly(butyl cyanoacrylate)-Nanoparticles - Influence of stabilizer and drug: polymer ratio on size, polymerization yield, loading and capacity." International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf, 27-30 März 2006

Petri, B., A. Bootz, A. Khalanski, T. Hekmatara, R.H. Müller, J. Kreuter and S. Gelperina (2006) "Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin loaded surfactant-coated Poly(butyl cyanoacrylate) Nanoparticles: Towards a mechanism of action." International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf, 27-30 März 2006

Bootz, A., M. G. Anhorn, A. Heinzelmann, H. v. Briesen, K. Langer, J. Kreuter (2006) "Uptake of Human Serum Albumin Nanoparticles in Macrophages Assessed by Transmission Electron Microscopy." 33rd Annual Meeting Controlled Released Society, Wien, 22-26 Juli 2006 (eingereicht)